

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Direktor: Prof. Dr. Th. M. Gress

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Untersuchung zur Funktion der
regulatorischen Untereinheiten p50 α , p55 α und p85 α
der Phosphoinositid-3-Kinase in der
beta-Zell-Linie INS-1E

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von
Philipp Niebel
aus Heidelberg

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 27.11.2008

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. D. Hörsch

Korreferent: PD Dr. W. Meißner

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Phosphoinositide, Substrate der PI3-Kinasen	1
1.2 Klassen der PI3-Kinasen	4
1.3 Eigenschaften der PI3-Kinasen der Klasse IA	7
1.3.1 Aufbau.....	7
1.3.2 Aktivierung.....	9
1.3.3 Umsetzung von Phosphoinositiden.....	12
1.4 Abhängige Signalwege der PI3-Kinase und zelluläre Funktionen.....	12
1.4.1 Zelluläre Funktionen.....	12
1.4.2 Proteinkinase B.....	13
1.4.3 Glukosestoffwechsel.....	14
1.4.4 Zellproliferation und Wachstum.....	15
1.4.5 Apoptose.....	16
1.5 Fragestellungen.....	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.2 Zusammensetzung der Reagenzien.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 Stimulation	25
2.2.3 Adenoviraler Gentransfer.....	25
2.2.4 RNA-Interferenz.....	27

2.2.5 FACS-Zellzyklusanalyse.....	28
2.2.6 Immunopräzipitation.....	30
2.2.7 Immundepletion.....	30
2.2.8 Gelelektrophorese und Western Blot.....	31
2.2.9 PI3-Kinase-Assay.....	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Identifizierung der Untereinheiten.....	34
3.2 Verhältnis der Untereinheiten.....	35
3.3 Stimulierbarkeit der Zellen.....	37
3.4 Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten.....	37
3.5 Reduktion von p85 α durch RNA-Interferenz.....	44
3.6 Zellzyklusanalyse.....	47
3.7 PI3-Kinase-Assay.....	53
4. Diskussion	54
4.1 Funktionen der regulatorischen Untereinheiten auf Ebene der PI3-Kinase	54
4.2 Funktionen auf untergeordneten Ebenen	58
4.3 Einflüsse auf parallele Wege der Signaltransduktion.....	60
4.4 Schlussfolgerungen und Aussichten.....	61
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Anhang	76
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	76
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	78

7.3 Lebenslauf.....	80
7.4 Verzeichnis akademischer Lehrer.....	81
7.5 Danksagung.....	82
7.6 Ehrenwörtliche Erklärung.....	83

1. Einleitung

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) sind essenzielle Enzyme für Zellwachstum und Zellzyklusregulation. Als Lipidkinasen phosphorylieren sie Phosphoinositide (PI), die als sekundäre Transmitter eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion spielen. Die Regulation des Glukose-Stoffwechsels der Zelle durch diese Transmitter sowie deren Rolle bei Apoptose und Zellzyklusregulation sind notwendig für das Überleben der Säugetierzelle (Katso et al. 2001, Vanhaesebroeck und Alessi 2000).

Neben dieser ubiquitären Funktion für glukosesensitive Zellen besitzen die PI3-Kinasen spezielle Funktionen in vielen Geweben und sind an der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes mellitus, Karzinomen und Immundefekten beteiligt (Katso et al. 2001, Vara et al. 2004, Stumvoll et al. 2005).

Die PI3-Kinasen sind funktionelle Heterodimere, die aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit bestehen. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der regulatorischen Untereinheiten p85 α , p55 α und p50 α der PI3-Kinase der Klasse IA im Hinblick auf die Funktionen für untergeordnete Signalwege, der Aktivität der PI3-Kinase und der Bedeutung für Wachstum und Zellzyklusregulation in der beta-Zelle des Pankreas untersucht werden.

1.1 Phosphoinositide, Substrate der PI3-Kinasen

Die Substrate der Phosphoinositid-3-Kinasen sind Lipide, die über Phosphorsäure mit einem Inositol-Ring verbunden sind (Abb. 1). Wenn dieser Inositol-Ring keine weiteren Phosphatreste an den Positionen 3' bis 5' enthält, nennt man diese Lipidverbindung Phosphatidylinositol (PtdIns).

Phosphatidylinositol ist ein membranständiges Molekül; während die lipophilen Fettsäurereste in die zum Zytosol gerichtete Schicht der Lipid-Zellmembran integriert sind, ragt der polare Inositolrest in das Zytoplasma. Die Hydroxyl-Gruppen (-OH) des Inositolringes können *in vivo* an den Stellen 3' bis 5' in verschiedenen Kombinationen phosphoryliert werden, diese Derivate des

Phosphatidylinositols werden als Phosphoinositide (PI) bezeichnet. Die Phosphorylierung an den Stellen 3'–5' des Inositol-Ringes geschieht dabei durch entsprechende PI3-, PI4- und PI5-Kinasen. Die PI3-Kinase phosphoryliert den Inositol-Ring an der 3'-Position durch den Transfer der terminalen Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (Divecha und Irvine 1995, Fruman et al. 1998).

In vivo existieren alle möglichen Phosphorylierungs-Kombinationen: Die Monophosphoinositide PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(5)P, die Bisphosphoinositide PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ sowie das Trisphosphoinositid PtdIns(3,4,5)P₃, das auch als PIP₃ bezeichnet wird. Durch die Konstellationen der Phosphatgruppen am Inositolring ergeben sich spezifische zelluläre Funktionen der Phosphoinositide. Die für die Signalübertragung wichtigste Rolle spielen PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P₂, wobei ersteres in der Säugetierzelle in größerer Menge vorkommt (Vanhaesebroeck et al. 2001).

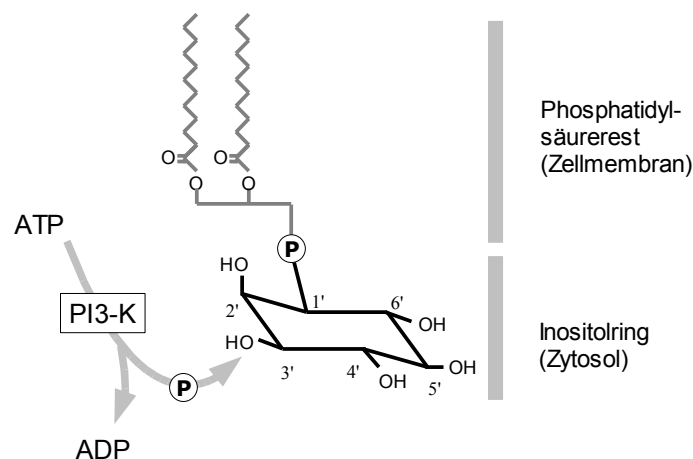


Abbildung 1: Die Aufbau von Phosphatidylinositol und die Phosphorylierung durch die PI3-Kinasen an der 3'-Position des Inositol-Ringes (Vanhaesebroeck et al. 2001)

Die Wirkung der Phosphoinositide an Protein-Zielstrukturen wird über verschiedene Lipid-bindende Regionen vermittelt. Die wichtigsten sind PH, Phox, FYVE, ENTH, ANTH, FERM, tubby sowie verschiedene Zytoskelett-Proteine. Durch ihre unterschiedliche Verteilung und Substratspezifität spielen diese eine wichtige Rolle bei der Spezifität der Wirkungen der PI3-Kinasen. Die *pleckstrin homology domain* (PH) war die erste identifizierte Phosphoinositidbindende Struktur. Sie ist weit verbreitet und findet sich auf einer großen Zahl von Signaltransduktions-Proteinen wie Proteinkinasen (*phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK), Proteinkinase B (PKB), β -ARK, *brutons tyrosinkinase*), Phospholipasen (PLC γ 1, PLC δ 1, PLD), Regulatoren von kleinen GTPasen und verschiedenen Adapter-Proteinen des Vesikel-Transportsystems. *PH domains* auf diesen Proteinen sind spezifisch für PtdIns(3,4,5)P₃ und/oder PtdIns(4,5)P₂ und/oder PtdIns(3,4)P₂. Die PH-Domänen rekrutieren ihre Trägerproteine PI-abhängig zur Plasmamembran und ermöglichen so deren Aktivierung (Itoh und Takenawa 2002, Lemmon 2003).

Die 5'-Inositol-Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) dephosphoryliert PtdIns(3,4,5)P₃ etwas verzögert zu PtdIns(3,4)P₂, das hauptsächlich über diesen Weg produziert wird. PTEN kann auch die anderen 5'-phosphorylierten PIs umsetzen und deren Wirkung beenden. In einer Reihe von menschlichen Tumoren ist das Tumor-Suppressor-Gen PTEN durch Mutationen deaktiviert, was zu einer erhöhten Konzentration von Phosphoinositiden und dauerhaft aktivierten PI3-Kinase-Signalwegen führt (Vazquez und Seller 2000, Downes et al. 2001). Die *SH2 domain containing inositol 5-phosphatases* (SHIP) haben ähnliche Eigenschaften, bewirken den Abbau der Phosphoinositole, bevorzugt von PtdIns(3,4,5)P₃, jedoch durch Hydrolyse (Rohrschneider et al. 2000).

Neben der Phosphorylierung durch die PI-Kinasen sind die Phosphoinositide noch in einem weiteren Signaltransduktionsweg beteiligt, der oft als „klassischer“ Phosphoinositid-Weg bezeichnet wird. Dabei wird PtdIns(4,5)P₂ von der Phospholipase C umgesetzt, die daraus die zwei *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃) produziert. Während

DAG verschiedene Isoenzyme der Proteinkinase C aktiviert, erhöht IP_3 die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Die 3'-phosphorylierten Produkte der PI3-Kinasen werden von der Phospholipase C nicht umgesetzt (Alberts et al. 2002).

1.2 Klassen der PI3-Kinasen

Acht verschiedene PI3-Kinasen wurden bis heute in Säugetieren identifiziert, die auf der Basis von Proteinstruktur, Substratspezifität und Regulation in die Klassen I-III eingeteilt werden (Übersicht in Tab. 1). Unter Klasse IV fasst man verschiedene PI3K-verwandte Kinasen zusammen (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999, Foster et al. 2003). Die Klassifikation der PI3-Kinasen richtet sich dabei hauptsächlich nach der Struktur der katalytischen Untereinheiten;

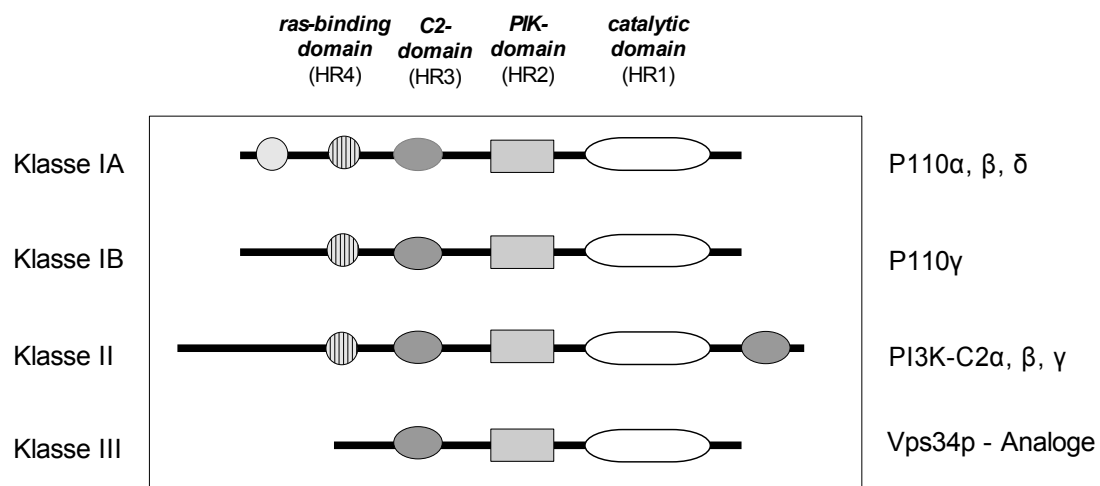


Abbildung 2: Die definierenden Struktureigenschaften (*homology regions, HR*) der katalytischen Untereinheiten der verschiedenen PI3-Kinase-Klassen in Säugetieren. HR1, auch *kinase core domain* genannt, vermittelt die Lipikinaseaktivität und kommt in allen Klassen vor. HR2, auch als *PIK domain* bezeichnet, wirkt aktivierend auf die anderen Regionen. HR3 ist eine C2-ähnliche Domäne, die Kalziumabhängige und -unabhängige Interaktionen mit anderen Proteinen oder Lipiden vermittelt. HR4 ist eine *ras-binding domain*. Die regulatorischen Einheiten der Klasse IA binden an die N-terminale *adaptor-binding domain* der p110-Proteine, die aus ca. 100 Aminosäuren besteht (Domin und Waterfield 1997, Walker et al. 1999).

diese bestehen aus verschiedenen sequenzhomologen Strukturen, den *homology regions 1–4* (Abb. 2, Domin und Waterfield 1997, Walker et al. 1999, Djordjevic und Driscoll 2002).

Die PI3-Kinasen der Klasse I werden unterteilt in die Klassen IA und IB, die sich in Aufbau und Aktivierung unterscheiden (Domin und Waterfield 1997). Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Klasse IA; sie wird im Kapitel 1.3 genauer beschrieben.

Die Klasse IB-PI3-Kinasen sind weniger verbreitet als die Klasse IA. Ergebnisse aus *knockout-Mouse*-Modellen deuten auf eine Schlüsselrolle der IB-Kinasen als Modulatoren von Entzündungen und Allergien sowie in der Regulation der kardialen Kontraktionsfähigkeit hin (Crackower et al. 2002, Wymann et al. 2003). Die einzige bis heute bekannte Isoform der Klasse IB besteht aus der katalytischen Untereinheit p110 γ (Stoyanov et al. 1995). Klasse IB PI3-Kinasen werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Systeme (GPCR) aktiviert. Dies geschieht durch den G $\beta\gamma$ -Komplex, eventuell spielt dabei auch die G α -Untereinheit eine Rolle (Krugmann et al. 1999). Die Klasse IB-Kinasen werden wie die Klasse IA bei der Aktivierung an die Plasmamembran gebunden. Wie alle Kinasen der Klasse I können auch sie durch die GTP-gebundene kleine GTPase p21^{Ras} (*Ras*) aktiviert werden (Kodaki et al. 1994).

PI3-Kinasen der Klasse II sind große Proteine von 170–210 kDa, deren katalytische Einheit derjenigen der Klasse I-Kinasen nur zu etwa 50 % gleicht. In Säugetieren existieren die von verschiedenen Genen kodierten katalytischen Untereinheiten PI3K-C2 α , PI3K-C2 β und PI3K-C2 γ . Das N-terminale Ende des Proteins enthält Prolin-reiche Regionen, die auf Protein-Protein-Interaktionen schließen lassen. Das C-terminale Ende enthält Phox- und C2-Domänen, die ebenfalls auf Protein- oder Lipid-Bindungen hinweisen (Domin et al. 1997). Die Aktivierungsmechanismen der Klasse II-Kinasen sind unklar. Tyrosin-Phosphorylierung, G-Protein-Interaktionen und Proteolyse könnten in verschiedenen Rezeptorsystemen eine Rolle spielen. Ihre vielfältigen Funktionen in der Zelle und das Vorkommen von *in-vivo*-Produkten sind nicht komplett verstanden

(Katso et al. 2001). *In vitro* können Klasse II-Kinasen PtdIns und PtdIns(4)P phosphorylieren (Foster et al. 2003).

Phosphoinositid-Kinasen der Klasse III weisen eine Sequenz-Homologie zu dem in Pilzen vorkommenden *vesicular protein-sorting protein* Vps34 auf (Herman und Emr 1990). Sie kommen in allen untersuchten eukaryontischen Zellen vor. Ihr einziges Produkt ist PtdIns(3)P. Dessen Spiegel in der Zelle ist so konstant, dass man annehmen kann, dass die Klasse III-Kinasen nicht durch Zell-Stimulation aktiviert werden, sondern konstitutiv wirken. Sie sind wahrscheinlich an verschiedenen intrazellulären Transportvorgängen wie

Klasse	Katalytische Untereinheiten	Regulatorische Untereinheiten	Aktivierung	<i>In-vivo</i> -Lipid-Substrate
IA	p110 α (PIK3CA auf 3q26.3)	p85 α , p55 α , p50 α (PIK3R1 auf 5q12-q13)		
	p110 β (PIK3CB auf 3q23)	p85 β (PIK3R2 auf 19q13.2)	- Tyrosinkinasen - Ras	PtdIns(4,5)P ₂
	p110 δ (PIK3CD auf 1p36.2)	p55 γ (PIK3R3 auf 1p34.1)		
IB	p110 γ (PIK3CG auf 7q21.11)	p101 (PI3-kinase regulatory subunit gene, 17p13.1)	- G-Proteine - Ras	PtdIns(4,5)P ₂
II	PI3K-C2 α (PIK3C2A auf 11p15.5-p14)			
	PI3K-C2 β (PIK3C2B auf 1q32)	unklar	- Tyrosinkinasen - Chemokine?	PtdIns(4)P
	PI3K-C2 γ (PIK3C2G auf 12p12)			
III	Vps34 (PIK3C3 auf 18q12.3)	p150 (PIK3R4 auf 3q22.1)	- konstitutiv	PtdIns

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Klassen der PI3-Kinase (humane Genlokalisationen; Fruman et al. 1998, Anderson und Jackson 2003).

Autophagie, Phagosomen-Bildung, Vesikel-Bildung und Golgi-Endosomen-Transport beteiligt (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999, Katso et al. 2001).

Als Klasse IV bezeichnet man eine Gruppe von PI3K-verwandte Kinasen, die Ser/Thr Protein-Kinase-Aktivität besitzen, Lipidprodukte konnten bisher nicht identifiziert werden. Mitglieder dieser Gruppe sind unter anderen mTOR (*mammalian target of rapamycin*), DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), ATR (*ataxia telangiectasia related*) und ATM (*ataxia telangiectasia mutated*, Vanhaesebroeck und Waterfield 1999).

1.3 Eigenschaften der PI3-Kinasen der Klasse IA

1.3.1 Aufbau

PI3-Kinasen der Klasse IA sind heterodimere Proteine, die aus einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit und einer assoziierten regulatorischen Untereinheit bestehen. Sie enthalten eine der drei katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ , die von drei verschiedenen Genen kodiert werden (Tab. 1). Diese sind Moleküle von 110–120 kDa Größe, die eine Homologie der Aminosäuresequenz von etwa 50 % aufweisen (Hiles et al. 1992). p110 α und p110 β sind in verschiedenen Geweben weit verbreitet, während p110 δ hauptsächlich in Leukozyten vorkommt (Vanhaesebroeck et al. 1997).

Die katalytischen Untereinheiten interagieren mit verschiedenen regulatorischen Untereinheiten und bilden mit diesen das heterodimere PI3K-Holoenzym. Bisher sind fünf regulatorische Untereinheiten bei PI3-Kinasen der Klasse IA bekannt. Die mit 85 kDa beiden größeren Untereinheiten p85 α und p85 β leiten sich von zwei verschiedenen Genen ab, dem Pik3r1-Gen und dem Pik3r2-Gen (Tab. 1). Sie besitzen eine Bindungsstelle für eine katalytische p110-Untereinheit, die von zwei *Src-homology 2 domains* (SH2) flankiert ist (Abb. 3). Diese SH2-Domänen dienen der Aktivierung der PI3-Kinase durch Bindung von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen. p85 α und p85 β enthalten an ihrem NH₂-terminalen Ende eine *Src-homology 3 domain* (SH3), an die zwei prolinreiche Region grenzen, sowie eine *break point cluster homology domain* (BRC), ver-

schiedene Interaktionen vermittelt werden (Abb. 3). Die kleineren Untereinheiten p50 α und p55 α enthalten ebenfalls die p110-Bindungsstelle und die beiden SH2-Domänen, jedoch keine SH3-Domäne. Sie sind alternativ zu p85 α gespleißte Produkte des Pik3r1-Gens von 50 KDa (p50 α) bzw. 55kDa (p55 α , auch AS53 genannt) Größe (Inukai et al. 1997, Fruman et al. 1996, Pons et al. 1995). p55 γ , auch p55^{PIK} genannt, ist eine weitere Untereinheit, die strukturell p55 α ähnelt, aber von einem anderen Gen, dem PIK3R3-Gen, kodiert wird. Sie kommt vor allem in Hirn- und Hodengewebe vor und wird hauptsächlich von IRS-1 aktiviert (Insulin-Rezeptor-Substrat 1, Pons et al. 1995). Während p85 α und p85 β ubiquitär exprimiert werden, zeigen die kleineren Untereinheiten eine unterschiedliche Verteilung in den Geweben, was auf eine zellspezifische Rolle hindeutet (Fruman et al. 1996, Antonetti et al. 1996, Hörsch und Kahn 1999).

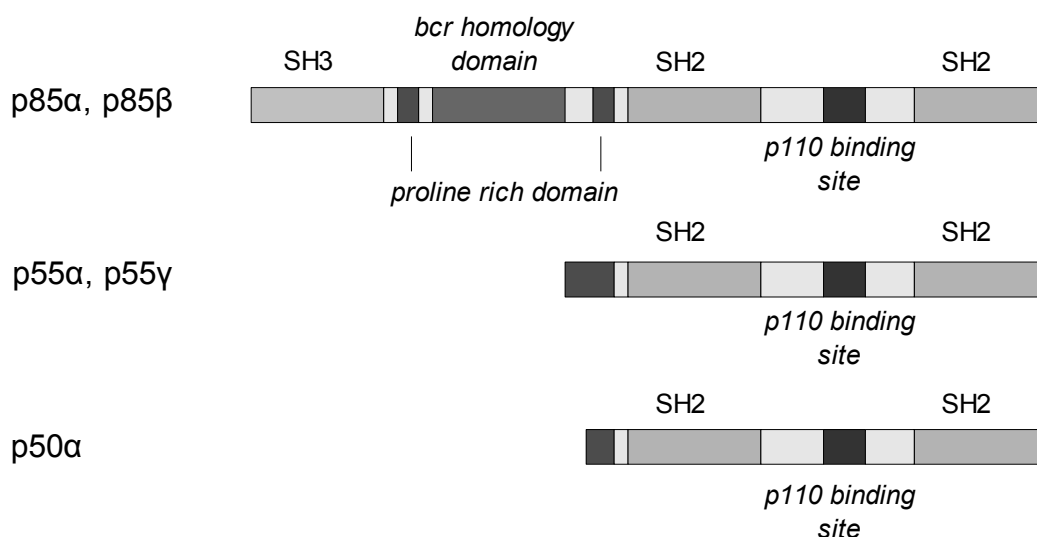


Abbildung 3: Struktur der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase Klasse IA (Inukai et al. 1997)

1.3.2 Aktivierung

Die Aktivierung der Klasse IA PI3-Kinasen erfolgt durch die Bindung von aktivierten Tyrosinkinassen an die zwei *SH2 homology regions* der regulatorischen Untereinheiten. Die Klasse IA-Kinasen zeigen besondere Affinität zu Proteinen, die Phosphotyrosine in einem pYXXM-Motiv oder einem pYMXM-Motiv enthalten, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (Virkamäki et al. 1999). Es kann sich dabei um Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität wie den Insulin- oder IGF-1-Rezeptor handeln (Kido et al. 2001). Diese bestehen aus zwei α -Ketten sowie zwei β -Ketten, letztere besitzen eine Tyrosinkinaseaktivität und durchlaufen bei der Rezeptoraktivierung durch extrazelluläre Ligandenbindung eine Reihe von Autophosphorylierungen. Weitere mögliche Proteine mit Tyrosinkinase-Aktivität sind nicht-Rezeptor-gebundene Tyrosinkinassen wie die src-Familie-Kinase oder die JAK-Kinase, die z. B. bei T-Zell und B-Zell-Rezeptoren in Immunzellen eine Rolle spielen (Fruman und Cantley 2002), sowie eine Vielzahl anderer Tyrosinkinassen (Wymann und Pirola 1998).

An die autophosphorylierten β -Ketten binden die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS). Diese Gruppe umfasst neun bekannte Proteine (IRS-1 bis IRS-9) mit spezifischen Funktionen, von denen IRS-1 bis IRS-4 für die Signaltransduktion zur PI3-Kinase die größte Bedeutung haben (White 1997). Sie werden von der Tyrosinkinase des Rezeptors an mehreren Stellen phosphoryliert, wodurch Bindungsstellen für *SH2 domains* entstehen. Nach der Dissoziation der IRS vom Insulin/IGF-1-Rezeptor werden die regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase als Zielproteine an diese gebunden und aktiviert (Antonetti et al. 1996).

Der Aktivierungsvorgang der PI3-Kinasen ist komplex. Die regulatorische Untereinheit p110 α ist in Säugetieren bei 37° C instabil und erlangt erst in Verbindung mit p85 α thermale Stabilität. Die PI3-Kinase ist in dieser heterodimeren Konfiguration jedoch inaktiv, da p85 α durch seine Bindung an die katalytische Untereinheit gleichzeitig deren Aktivität mindert. Die Aktivierung erfolgt erst durch die Bindung der phosphorylierten Tyrosinresiduen (Yu et al. 1998). Durch die Assoziation mit phosphorylierten Tyrosinkinassen an den N-terminalen *SH2 domains* verliert p85 α die inhibitorische Wirkung, die Lipid-

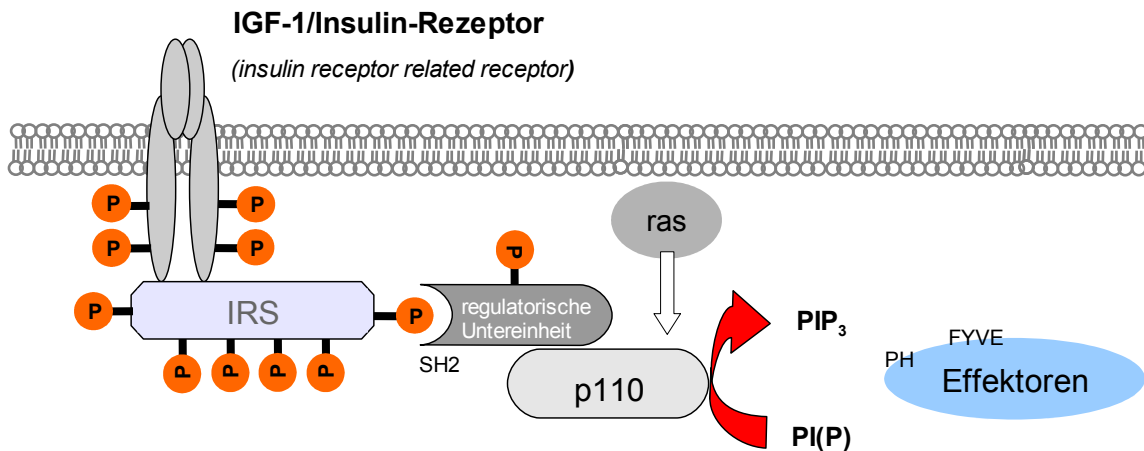


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung der PI3-Kinase (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999).

kinaseaktivität des Holoenzym nimmt zu (Cuevas et al. 2001, Chan et al. 2002).

Im Rahmen der Aktivierung wird die katalytische Untereinheit durch die Bindung der SH2-Regionen der regulatorischen Untereinheit an die membranständigen IRS von der zytosolischen Position des inaktiven Zustandes an die Plasmamembran gebunden. Erst dort kann die ATP-abhängige Phosphorylierung von Phosphoinositiden der Zellmembran stattfinden.

Möglichkeiten der Regulation ergeben sich aus der direkten Interaktionen von verschiedenen Enzymen mit den regulatorischen und katalytischen Untereinheiten. Beispiele sind die Interaktion der regulatorischen Untereinheiten mit CDC42 und Rac (Zheng et al. 1994, Talias et al. 1995, Beeton et al. 1999), die an die Bcr-homologe Region binden sowie die src-Familie-Kinase mit der *SH3 domain* (Pleiman et al. 1994).

Die PI3-Kinase besitzt auch Proteinkinase-Aktivität, so kann die katalytische Untereinheit die regulatorischen Untereinheiten an Serinresten phosphorylieren.

Die Phosphorylierung von p85 α an Ser⁶⁰⁸ bewirkt eine starke Lipidkinase-Aktivitätsabnahme der PI3-Kinase, wozu sowohl p110 α als auch p110 β in der Lage sind (Dhand et al. 1994). Darüberhinaus können die PI3-Kinasen eine Phosphorylierung von IRS-Proteinen mit konsekutiver Lipidkinase-Aktivitätsminderung bewirken (Lam et al. 1994).

Eine weiterer Aktivierungsweg der PI3-Kinasen der Klasse I verläuft über die GTP-abhängige kleine GTPase p21^{Ras} (*Ras*, Kodaki et al. 1994, Rodriguez-Viciana et al. 1996). Die Familie der *Ras*-Proteine ist an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt und hat vielfältige Funktionen bei der Regulation von Apoptose und Zellwachstum (Rebollo und Martinez 1999, Olson und Marais 2000). Aktivierte *Ras*-Proteine können dabei entgegengesetzte Effekte bewirken, was durch die Wirkung von *Ras* auf unterschiedlichen Signalkaskaden erklärt wird. Der hemmende Einfluss auf die Apoptose wird über die Aktivierung der PI3-Kinase vermittelt, während eine Förderung der Apoptose über den *mitogen-activated protein kinase*-Weg (MAP-Kinase) möglich ist (Downward 1998).

Die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase geschieht über die Bindung der GTP-assoziierten, aktivierten Form von Ras an die *ras binding domain* (RBD) der p110-Untereinheiten. Diese Aktivierung wird im inaktiven Zustand der PI3-Kinase von p85 α gehemmt, was erst durch die Stimulation der Zelle und Tyrosinkinaseaktivität aufgehoben wird (Jiménez et al. 2002). Die Divergenz in der Primärstruktur von p100 α , p110 β und p110 δ ist in der Ras-bindenden Domäne am größten, was Unterschiede in der Aktivierung durch Ras vermuten lässt (Deora et al. 1998). Die Aktivierung von Ras selbst geschieht in mehreren Schritten. Über phosphorylierte Tyrosinkinase-Rezeptoren, die an das Adapter-Protein GRB2 binden, wird der Ras-Aktivator Sos zur Zellmembran transportiert. Dieser erhöht dort den Anteil von GTP und damit die Aktivität von Ras (Macaluso et al. 2002).

1.3.3 Umsetzung von Phosphoinositiden

Die PI3-Kinasen der Klasse I können in Säugetierzellen alle Phosphoinositide mit freier 3'-Position am Inositol-Ring phosphorylieren, man findet die Produkte PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ (PIP₂) und PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃).

Die basalen Level von PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ sind im Gegensatz zu PtdIns(3)P sehr niedrig und steigen bei Stimulation der Zellen stark an. *In vivo* ist das bevorzugte Substrat PtdIns(4,5)P₂, das zu PtdIns(3,4,5)P₃ umgesetzt wird (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999, Vanhaesebroeck et al. 2001).

Die Phosphatasen PTEN und SHIP beenden durch den Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ deren Aktivität und sind somit funktionelle Gegenspieler der PI3K (siehe 1.1).

1.4 Abhängige Signalwege der PI3-Kinase und zelluläre Funktionen

1.4.1 Zelluläre Funktionen

Die PI3-Kinasen sind für ein breites Spektrum an biologischen Effekten verantwortlich, unter anderem Zellwachstum und -proliferation, Apoptoseregulation, Vesikeltransport, Zytoskelettorganisation, Zellkontakte, Chemotaxis sowie Glukosestoffwechsel (Wymann und Pirola 1998, Vara et al. 2004, Hirsch et al. 2007).

Während die verschiedenen Klassen meist spezielle biologische Funktionen in bestimmten Zelltypen wahrnehmen, haben die PI3-Kinasen der Klasse IA ubiquitäre Funktionen, die für Zellproliferation und Wachstum, Glukosestoffwechsel und Apoptoseregulation essenziell sind. Diese werden über die 3'-phosphorylierten Lipidprodukte vermittelt, die an entsprechende Strukturen an ihren Zielen binden (vgl. 1.1). Das wichtigste Ziel ist die Achse *phosphatase dependent kinase* (PDK) – Proteinkinase B, über die eine Vielzahl von Effektoren reguliert wird (Coffer et al. 1998). Weitere Ziele der PI3-Kinase sind die Proteinkinasen A, G, C, die Tyrosinkinasen Tec und Btk, die Phospholipase Cy und kleine GTPasen der Rho- und Arf-Familie (Hirsch et al. 2007).

1.4.2 Proteinkinase B

Die 57 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase B (PKB, auch *Akt* oder *c-Akt*) ist der wichtigste Effektor der PI3-Kinase. In Säugetieren existieren die Isoformen PKB α (*Akt-1*), PKB β (*Akt-2*) und PKB γ (*Akt-3*), wobei die α - und β -Isoformen in menschlichen Geweben weit verbreitet sind, während die PKB γ hauptsächlich in Gehirn und Hoden vorkommt (Coffer et al. 1998). Die PKB bestehen aus einer N-terminalen *PH domain*, einer *kinase domain* und einem C-terminalen regulatorischen Bereich. In ruhenden Zellen befindet sich die PKB im Zytosol, bei einer Stimulierung der Zelle wird sie aktiviert und dabei zur Zellmembran verlagert (Vanhaesebroeck und Alessi 2000).

Diese Aktivierung läuft in zwei Schritten ab. Die Proteinkinase B bindet mit ihrer N-terminalen *PH domain* an membranständige phosphorylierte Phosphoinositide, die durch die aktivierte PI3-Kinase produziert werden (Franke et al. 1997, Stokoe et al. 1997). PtdIns(3,4,5)P₃ oder PtdIns(3,4)P₂ aktivieren die PH-Domäne dabei mit der größten Affinität. Dadurch erfolgt die Verlagerung zur Zellmembran, es findet jedoch noch keine Aktivierung der Proteinkinase-Aktivität statt. Durch die Bindung der PH-Domäne geht die PKB eine Konformationsänderung ein, wodurch die Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ ermöglicht wird. Für die volle Aktivierung müssen beide dieser Aminosäuren der PKB α phosphoryliert werden, Thr³⁰⁸ in der Kinase-Domäne und Ser⁴⁷³ in der C-terminalen Region. Geschieht dies nur an Thr³⁰⁸, findet nur eine partielle Aktivierung statt, während eine alleinige Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ keine Steigerung der Aktivität nach sich zieht (Song et al. 2005). Die Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ geschieht durch die *Phosphoinositide dependent kinase 1* (PDK-1). Dabei handelt es sich um eine 63 kDa große Ser/Thr-Kinase mit einer C-terminalen PH-Domäne und einer N-terminalen Kinase-Domäne, die ubiquitär in menschlichen Geweben vorkommt (Vanhaesebroeck und Alessi 2000). Durch die spezifische Bindung von Produkten der PI3-Kinase an der PH-Domäne aktiviert, phosphoryliert PDK-1 die Proteinkinase B an Thr³⁰⁸. Daneben phosphoryliert PDK-1 eine Reihe weiterer Proteine wie Proteinkinasen der Klasse A, PKC α , β I, β II, γ und ζ sowie die p70-S6-Kinase (Belham et al. 1999).

Auch die PH-Domäne der PDK-1 bindet PtdIns(3,4,5)P₃ oder PtdIns(3,4)P₂ mit größerer Affinität als andere Phosphoinositide (Vanhaesebroeck und Alessi 2000).

Die Phosphorylierung der Proteinkinase B an Ser⁴⁷³ hingegen ist nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Mögliche Aktivatoren sind die PDK-1, eine andere Isoform (PDK-2) oder eine Autophosphorylierung durch die PKB (Song et al. 2005). Möglicherweise ist auch eine weitere Proteinkinase, die *integrin-linked kinase* (ILK), daran beteiligt (Lynch et al. 1999, Persad et al. 2001).

Neben der PI3K der Klasse I kann die PKB auch auf anderen Wegen aktiviert werden, hauptsächlich durch cAMP-erhöhende Stoffe wie Forskolin, chlorophenylthio-cAMP, Prostaglandin-E1, und 8-bromo-cAMP. Dabei wird die PH-Domäne nicht mit einbezogen, sondern die PKB an Thr³⁰⁸ phosphoryliert, was durch die Proteinkinase A induziert wird (Filippa et al. 1999).

1.4.3 Glukosestoffwechsel

Die Proteinkinase B ist für die Wirkung von Insulin auf den Glukose-Stoffwechsel der Säugetier-Zelle von zentraler Bedeutung (Saltiel und Kahn 2001). Die Aktivierung der Achse Insulin-Rezeptor – IRS-1/IRS-2 – PI3-Kinase – PKB ist der wichtigste Signaltransduktionsweg, der nach Aktivierung des Insulin-Rezeptors den Transfer des Glukose-Transporters 4 (GLUT4) von intrazellulären Kompartimenten zur Zellmembran initiiert, wodurch die Glukose-Aufnahme in die Zelle stattfinden kann (Kohn et al. 1996, Lizcano und Alessi 2002). Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise beteiligt ist das PKB-aktivierte Protein AS160 und/oder die *FYVE domain-containing PtdIns3P 5 Kinase* (PIKfyve; Ishiki und Klip 2005, Berwick et al. 2004).

Der GLUT4-Transfer ist weiterhin durch die ebenfalls PI3K/PDK-aktivierten Proteinkinase-C-Isoformen γ und ζ sowie über das PI3K-unabhängig aktivierte Cbl-assoziierte Protein und die kleine Rho-Kinase TC10 möglich (Khan und

Pessin 2002). Als weitere Wirkung des Insulins bewirkt die PKB einen Anstieg der Glykogen-Synthese in der Säugetierzelle. Nach der Aktivierung phosphoryliert und inaktiviert die PKB die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3), die daraufhin die Glykogen-Synthase nicht mehr phosphoryliert und damit nicht mehr inhibiert. Dadurch nimmt deren Aktivitätszustand zu und es wird vermehrt Glykogen gebildet. Über die Phosphorylierung und Hemmung der GSK-3 wird auch eine metabolische Regulierung der Apoptose vermittelt (Cross et al. 1995, van Weeren et al. 1998, Summers et al. 1999).

1.4.4 Zellproliferation und Wachstum

Die Familie der S6-Kinasen ist für Zellwachstum und Proliferation wichtig, sie bewirken eine generelle Aktivierung des ribosomalen Biosynthese-Apparates und damit eine verstärkte Proteinsynthese, was Voraussetzung für den Progress des Zellzyklus ist (Dufner und Thomas 1999, Kozma und Thomas 2002). Die p70-S6-Kinase und die p85-S6-Kinase, benannt nach ihrer Molekülgröße, werden auch unter der Bezeichnung S6K1 zusammengefasst. Diese Kinasen sind für die Translation einer bestimmten Familie mRNAs verantwortlich, der 5'TOP-mRNAs, die die Komponenten des Translationsapparates wie ribosomale Proteine und Translations-Elongations-Faktoren kodieren, die für Zellwachstum und Proliferation essenziell sind. Diese Regulierung erfolgt über die multiple Phosphorylierung des 40S-ribosomalen Proteins S6. Als weitere Funktionen der S6-Kinasen sind eine Inaktivierung des BAD-Proteins und eine Rolle bei der Regulierung der Zellmotilität beschrieben (Harada et al. 2001, Berven und Crouch 2000). Die Aktivierung und Regulierung der S6-Kinasen ist komplex (Pullen und Thomas 1997, Weng et al. 1998). Wichtige Aktivatoren sind *mammalian target of rapamycin* (mTOR; Asnaghi et al. 2004, Xu et al. 2004) und als PI3K-Effektoren PDK-1 (Pullen et al. 1998) und PKC-Isoformen (Romanelli et al. 1999).

Glykogen-Synthase-Kinase 3 spielt neben seiner metabolischen Aktivität (siehe S. 14) auch eine Rolle in der Zellzyklusregulation. Durch die Phosphorylierung von Cyklin D wird dieses degradiert, wodurch eine Zellzyklusprogression ver-

hindert wird (Diehl et al. 1998, Muise-Helmericks et al. 1998). Durch die inhibierende Phosphorylierung der GSK-3 wirkt die PKB somit proliferationsfördernd. GSK-3 phosphoryliert weiterhin β -Catenin, das dadurch stabilisiert und in den Zellkern verlagert wird, wo es die Transkription verschiedener Gene, darunter Cyclin D, induziert, was eine Phosphorylierung und Inhibierung von Rb und dadurch eine Zellzyklusprogression bewirkt. Daneben interagiert p85 α auch direkt mit β -Catenin (Espada et al. 2005). Eine ähnliche Wirkung ist durch die Phosphorylierung von p27^{Kip1} beschrieben (Liang et al. 2002, Viglietto et al. 2002, Shin et al. 2002).

Durch Phosphorylierung verhindert die Proteinkinase B auch den Eintritt von p21^{Kip1/WAF} in den Zellkern und hemmt dadurch dessen antiproliferative Wirkung (Zhou et al. 2002).

1.4.5 Apoptose

Die Proteinkinase B hat einen anti-apoptotischen Effekt und bewirkt damit eine Verzögerung des Zelltodes und ein längeres Überleben der Zelle. Das geschieht auf vielfältige Art durch die Phosphorylierung verschiedener Downstream-Effektoren und ist nicht in allen Details bekannt (Coffer et al. 1998, Vanhaesebroeck und Alessi 2000, Song et al. 2005).

Ein wichtiges Ziel ist dabei das BAD-Protein (Bcl-2/Bcl-XL-Antagonist, *causing cell Death*), das Heterodimere mit Bcl-2 und Bcl-XL bildet. Wenn es durch die PKB an Ser¹¹² oder Ser¹³⁶ phosphoryliert und damit inaktiviert wird, kann es mit diesen nicht länger interagieren, dadurch können Bcl-2 und Bcl-XL anti-apoptotisch wirksam werden. Bcl-2 wird auch durch *cAMP response element-binding protein* (CREB) aktiviert, einem weiteren Ziel der PKB (Datta et al. 1997).

Caspase 9 ist eine Protease, die für die Initiierung und für spätere Stadien der Apoptose unerlässlich ist. Menschliche Caspase 9 wird durch PKB phosphoryliert und damit inhibiert (Cardone et al. 1998).

Weitere Ziele der PKB sind drei Mitglieder der Forkhead-Transkriptions-Faktoren-Familie, FHKR, FKHL1 und AFX (Brunet et al. 1999, Brownawell et al. 2001). An mindestens drei Abschnitten phosphoryliert, interagieren diese im Zytosol mit 14-3-3-Proteinen und verhindern, dass diese im Nukleus ihre proapoptotischen Ziel-Gene transkribieren (Nakamura et al. 2000).

Die Proteinkinase B aktiviert weiterhin indirekt die Stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK), die aus den beiden Gruppen der JNK und p38 MAPK besteht. Dies geschieht über Interaktionen mit den SAPK-Aktivatoren ASK1, MLK3 sowie SEK1 und bewirkt eine Inhibition der Apoptose (Song et al. 2005).

PKB aktiviert daneben I κ B-Kinasen (IKKs), was den Effekt hat, dass der Transkriptionsfaktor Nf κ B im Nukleus die Produktion von anti-apoptotischen Proteinen wie die *inhibitor of apoptosis*-(IOA)-Proteine cIAP1 und c-IAP2 bewirkt. Der genaue Mechanismus der IKK-Aktivierung durch die PKB ist unklar (Kane et al. 1999).

Weitere Mechanismen, durch die die PKB antiapoptotisch wirksam ist, sind die Aktivierung von Mdm2, welches wiederum p53 hemmt sowie die Inhibierung von YAP (*Yes associated protein*), das über das Protein Bax proapoptotische Wirkung hat (Song et al. 2005).

1.5 Fragestellungen

Aufgrund der vielfältigen Funktionen für Entwicklung und Überleben der Zelle war die PI3-Kinase Gegenstand vieler Untersuchungen. Der Schwerpunkt lag dabei vornehmlich auf den katalytischen Untereinheiten sowie auf den größeren Untereinheiten p85 α und p85 β . Über die kleineren Untereinheiten p50 α und p55 α ist weit weniger bekannt. Diese Arbeit soll die Funktionen der drei regulatorischen Untereinheiten in den β -Zellen des Pankreas untersuchen und vergleichen sowie den Ergebnissen anderer Arbeiten gegenüberstellen. Als Zellmodell dient dabei die Ratten- β -Zelllinie INS-1E.

Folgende Aspekte sollen untersucht werden:

- Wie ist die Verteilung der Untereinheiten der PI3-Kinase in β -Zellen?
- Welche Funktionen haben die regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase in der untergeordneten Signaltransduktion der β -Zelle? Dazu sollen Veränderungen auf der Ebene dieser Enzyme, abhängig von differenzierter Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten, mittels adenoviralen Gentransfers untersucht werden. Diese Veränderungen sollen auf der Ebene der Proteinkinase B sowie untergeordneter Signalwege dargestellt werden. Auch die Auswirkungen einer Reduzierung der regulatorischen Untereinheit p85 α durch RNA-Interferenz soll untersucht werden. Weiter sollen die Wirkungen einer Stimulation mit Glukose und IGF auf Zellen mit über- oder unterexprimierten Untereinheiten betrachtet werden.
- Welche Funktionen haben die regulatorischen Untereinheiten bei Proliferation und Zellzyklusregulation? Dazu sollen die Auswirkungen der im vorherigen Schritt beobachteten Veränderungen von Über und Unterexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf den Zellzyklus untersucht werden.
- Welche Rolle haben die regulatorischen Untereinheiten auf die Kinase-Aktivität der PI3-Kinase? Dies soll mit Hilfe eines PI3-Kinase-Assays nach differenzierter Unter- oder Überexprimierung untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Rekombinantes IGF-1 wurde von AF Schuetzdeller (Tübingen, Deutschland) geliefert. ECL (ECL western blotting detection reagents) und Filme (hyperfilm) kamen von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden). Ciprobay 200 mg wurde als Ciprofloxacin von Bayer (Leverkusen, Deutschland) bezogen. Bio-Rad (München, Deutschland) lieferte siLentFect Transfektionsreagenz, Protein-Assay und Broad-Range-Marker für Western blots. RMPI-1640-Medium wurde sowohl von Biowest (Nuaillé, Frankreich) als auch von Biowhitacker (Verviers, Belgien) bezogen, von letzteren auch Trypsin. Eastman Kodak Company (Rochester, USA) lieferte Kodak X-OMAT-AR-Filme. Pipettenspitzen 10–1000 µl kamen von Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Gibco (Karlsruhe, Deutschland) lieferte 2-Mercaptoethanol und Fötales Kälberserum (FCS).

Zellkultur-Pipetten, Zellkulturflaschen, Zellschaber stammten von Greiner bio-one (Frickenheim, Deutschland). Merck (Darmstadt, Deutschland) lieferte Silica-Gel-Dünnschichtchromatographie-Platten, Methanol, 1N-Salzsäure sowie Chloroform. Zellkultur-Pipetten, Falcon-Tubes, 6/12/24/96-wells, 10/20cm Petrischalen wurden von NUNC Brand (Roskilde, Dänemark) bezogen. Natriumpyruvat und HEPES-Puffer von PAA Laboratories (Linz, Österreich). RMPI-1640-Medium ohne Glukose war von PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland). Pierce (Rockford, USA) lieferte ECL (super signal west dura extended duration substrate). Die siRNA gegen p85 α stammte von Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA). Roth (Karlsruhe, Deutschland) lieferte Milchpulver, Ethanol, Retiphorese-Acrylamidlösung, Tris-Base, Tris-HCl.

Eppendorf-Cups kamen weiterhin von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland). Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland) lieferten Nitrocellulose Membranen (Optitran BA-S85). Von SERVA (Heidelberg, Deutschland) kamen Towbin-buffer und SDS. Sigma Chemical Co (St. Louis, USA) lieferte Dimethylsulfoxid (DMSO), Tween 20, Triton x-100, Glycerol, Orthovanadat, Bromphenol-

blau, Aprotinin und Leupeptin.

Cell signaling (Beverly, USA) lieferte Antikörper gegen Akt, phospho-Akt, GSK3, phospho-GSK3, p70s6-Kinase, phospho-p70s6-Kinase, S6-ribosomales Protein, phospho-s6-RP sowie anti-Mouse und anti-Rabbit-Zweitantikörper. Von Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA) waren unspezifische Kontroll-siRNA sowie Antikörper gegen p85 α .

Von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) wurden Antikörper gegen Hämagglutinin (HA), β -Aktin, Akt, phospho-Akt, β -catenin, phospho- β -catenin sowie anti-Goat-Zweitantikörper bezogen.

Der Antikörper (Clone B6) zur Detektion der Adenoviren ist gegen das *DNA-binding protein* gerichtet (Reich et al. 1983). Er wurde freundlicherweise von German Horn, Institut für Virologie, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Zusammensetzung der Reagenzien

Die Zusammensetzung von Zellkulturmedium (RPMI-1640 mit L-Glutamin), Stimulationsmedium, Lysis-Puffer, TBS-T (*tris buffered saline with tween*) PBS (*phosphate buffered saline*), Brattford-Lösung, SDS-Laufpuffer, Transferpuffer, Trenngelpuffer, Trenngellösung, Sammelgelpuffer, Sammelgellösung, Lämmli-Reagenz und Lösung zum Membranstrippen entsprachen dem Standard.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Als Modell für eine β -Zell-Linie dienten die Insulinomazellen INS-1E aus dem Pankreas der Ratte. Die INS-1E-Zellen stammten von Prof. Dr. Claes Wollheim, Département de Medicine, Division de Biochimie clinique, Université de Genève (Schweiz). In den Experimenten wurden, soweit nicht anders angegeben, die Passagen 87-100 genutzt. Die Viruspräparation der Adenoviren wurde mit der Zelllinie HEK-293 durchgeführt.

Charakteristika der INS-1 Zelllinie

Die INS-1-Zelllinie wurde 1992 von Wollheim et al. aus einem Röntgenstrahlen-induziertem Insulinom einer Ratte isoliert und charakterisiert (Asfari et al. 1992). INS-1-Zellen zeigen eine für Peptid-produzierende Zellen typische ultrastrukturelle Organisation. Mittels Immunfluoreszenz-Färbung mit entsprechenden Antikörpern lässt sich zeigen, dass die Zellen Insulin in sekretorischen β -Granula beinhalten, jedoch keins der anderen Insel-Hormone Glukagon, Somatostatin oder pankreatisches Polypeptid. Die sekretorischen Granula zeigen dabei morphologisch ein sehr variables Bild, das nur teilweise mit der typischen Struktur einer normalen insulin-produzierenden β -Zelle mit einem dichten Kern und einem peripheren klaren Hof übereinstimmt. Wie für native β -Zellen beschrieben, reagieren auch INS-1-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern A2B5 und R2D6, die beide gegen Ganglioside der Zelloberfläche gerichtet sind. Das kontinuierliche Wachstum und die stabile Insulin-Sekretion der INS-1 Zellen ist 2-Mercaptoethanol-abhängig. Diskutierte Mechanismen sind die Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes, Eingriffe in den Zellstoffwechsel, die Expression von Onkogenen oder die Aktivierung von Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (Asfari et al. 1992).

Da die INS-1 Zellen eine nicht-klonale Zelllinie sind, zeigte sich eine begrenzte Stabilität der beschriebenen Eigenschaften und Diskrepanzen in den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. Die Wollheim-Gruppe isolierte deshalb

anhand von Insulin-Gehalt und sekretorischer Antwort auf Glukose aus der INS-1-Linie die klonale Zelllinie INS-1E. Diese unterscheidet sich in ihren Eigenschaften wenig von der INS-1 Linie, ist aber auch nach 116 Passagen in ihren Eigenschaften stabil (Merglen et al. 2003).

Der durchschnittliche Insulingehalt der INS-1E-Zellen beträgt $2.3 \pm 0.11 \mu\text{g}/10^6$ Zellen, was etwa 10 % des Gehalts von natürlichen β -Zellen entspricht. Durch Glukosekonzentrationen von 2.5 bis 15 mM lässt sich die Insulinsekretion zunehmend bis auf das maximal 6.2fache (bei 15 mM) steigern. Die INS-1E Zellen weisen bezüglich der Sekretion β -Zell-typische Eigenschaften auf. Sie reagieren auf Sulfonylharnstoffe weniger als auf hohe Glukose-Konzentrationen, was sich durch den „*amplifying pathway*“ (nicht- K_{ATP} -abhängige Aktivierung) erklärt. In der Gegenwart von Forskolin und PDE-Hemmstoffen zeigt sich eine erhöhte Glukosesensitivität (Asfari et al. 1992). Die stimulatorisch wirkenden Substanzen Leucin, Arginin, Kaliumchlorid und die Hemmstoffe Somatostatin, Adrenalin und Diazoxid zeigen ebenfalls einen Effekt auf die Insulin-Sekretion.

Die intrazelluläre NAD(P)H- und ATP-Produktion und elektrophysiologische Eigenschaften wie der Schluss der K_{ATP} -Kanäle und die darauf folgende Depolarisation der Zellmembran durch Öffnung von Ca^{++} -Kanälen, der Anstieg von Kalzium im Zytoplasma und die nachfolgende β -Granula-Exozytose sind vergleichbar mit nativen β -Zellen. Unterschiede zeigen sich in einem überhöhten Aktionspotential und β -Zell-untypischen Sekretionsmustern (Merglen et al. 2003).

Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO_2 -Gehalt von 5 % bei 37° C im Brutschrank gehalten. Als Nährmedium diente das Medium RMPI-1640 mit L-Glutamin. Es enthielt zusätzlich 10 % fötales Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 50 μM β -Mercaptoethanol, 1 % Ciprofloxacin (Ciprobay 200, Bayer) sowie 2 mg/ml Glukose.

Die Zellen wurden etwa einmal pro Woche passagiert. Dabei wurde als erster Schritt das Medium entfernt. Mittlere Kulturflaschen wurden mit 2 ml, große Flaschen mit 3 ml Trypsin für mehrere Minuten im Brutschrank zwischeninkubiert. Wenn die Zellen sich dann vom Untergrund der Flasche gelöst hatten, wurden sie mit frischem, warmen Medium resuspendiert und in der gewünschten Menge in eine oder mehrere Flaschen überführt. Falls die Zellen für Experimente auf Platten ausgesät werden sollten, wurde vorher mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellmenge ausgezählt. Dazu wurden die abgelösten Zellen in Medium bei 1200 U/min fünf Minuten abzentrifugiert, das Medium entfernt und das verbleibende Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Von dieser Lösung wurden eine 1:10 Verdünnung mit PBS (*phosphate buffered saline*) hergestellt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellzahl dieser Verdünnung im Raster der Zählplatte vierfach ausgezählt und die Konzentration der Zellsuspension ermittelt, indem mit dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Zählkammerfaktor (10.000) multipliziert wurde.

Für die Durchführung der Experimente wurden die INS-1E Zellen in 6-well-Platten mit einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro well ausgesät. Nach 2–3 Tagen Kultivierung in 2 ml Medium pro well war dann eine Konfluenz von 60–70 % erreicht, bei der die Experimente durchgeführt wurden.

Lysieren der Zellen

Zum Lysieren wurde das Medium abgesaugt, pro Schale 100–500 µl Lysis-Puffer auf die Zellen gegeben, nach kurzem Einwirken mit einem Schaber von der Platte gelöst und in einen Eppendorf-Cup überführt. Das Lysat wurde für 15 Sekunden sonifiziert und anschließend die Zelltrümmer bei 12.000 U/min für fünf Minuten abzentrifugiert.

Um die Vergleichbarkeit der späteren Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Proben auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt, standardmäßig auf 2 µg Protein/µl. Dazu wurde eine Proteinbestimmung nach Brattford durchgeführt. In einer 96-well-Platte wurden pro well 250 µl Brattford-Lösung vorgelegt und in Doppelbestimmung eine Standardreihe mit BSA (bovines Serum-Albumin, 1 µg/µl) mit 0, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg und 8 µg pipettiert. Von den

Lysaten wurden in Doppelbestimmung jeweils 2 µl pro well verwendet. Die Blaufärbung der Brattford-Lösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen, die Werte in eine Software-Tabelle übertragen und die Konzentration der Proben durch Extrapolierung anhand der Standard-Reihe berechnet.

Mit Aqua dest. konnten die Proben dann auf die gleiche Konzentration eingestellt werden. Anschließend wurden sie mit Lämmli-Reagenz in einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren.

Einfrieren und Lagerung der Zellen

Die INS-1E Zellen wurden zum Einfrieren mit Trypsin von der Kulturflasche gelöst und mit etwas Medium bei 1200 U/min abzentrifugiert. Das verbleibende Pellet mit den Zellen wurde dann vorsichtig in FCS (fötales Kälberserum) mit einem Zusatz von 5 % DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in entsprechenden Einfrier-Cups in einem speziellen Einfrierbehältnis (*Nalgene Cryo 1 °C freezing container*), das ein kontinuierliches Temperaturabsinken gewährleistete, in einem Gefrierschrank bei -80 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Proben dann zur langfristigen Lagerung in einen Stickstofftank (-180 °C) überführt. Durch diese Art der Lagerung konnten mehrfach gleiche Passagen der Zellen wieder aufgetaut und für die Wiederholung einzelne Experimente verwendet werden.

2.2.2 Stimulation

Für verschiedene Versuche wurden die Zellen stimuliert. Dafür wurde acht Stunden vor der Stimulation das Nährmedium durch ein Stimulationsmedium („Hungermedium“) ersetzt. Dieses enthielt kein Serum (FCS), sonst aber alle Zusätze des Normalmediums. In zwei Versuchsreihen wurde Glukose in Konzentrationen von 2,5 mmol/l (45 mg/dl) und 15 mmol/l (270 mg/dl) eingesetzt. Nach sieben Stunden wurde das Hungermedium nochmals gewechselt. Stimuliert wurde mit 10 nM IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) für 10 Minuten und mit 50 μ M Forskolin für 60 Minuten. Nicht-stimulierte Kontrollen wurden mitgeführt.

2.2.3 Adenoviraler Gentransfer

Adenoviren

Die Adenoviren waren von *Ueki et al.* (2002) durch das Einfügen von p50 α -, p55 α -, und p85 α -cDNA sowie Influenza-Virus-Hämagglutinin-cDNA in die *swa-I site* der pAdex1CAwt-Cosmid-Kassette von Adenoviren hergestellt worden (Adex1CAp85a-HA, Adex1CAAS53-HA, und Adex1CAp50a-HA). Als Kontrolle diente ein Virus mit eingefügter β -Galactosidase-cDNA (*LacZ*, Miyake et al. 1996, Ueki et al. 2002).

Infektion der INS-1E-Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60 %–80 % in serumfreiem Medium infiziert. Die *multiplicity of infection* (MOI) betrug dabei je nach Versuch ca. 20–100. Nach zwei Stunden wurde ein Mediumwechsel auf Normalmedium durchgeführt. Eine erfolgreiche Infektion der Zellen äußerte sich in einer Veränderung der Morphologie, wobei die Zellen ihre unregelmäßige Form verloren und annähernd rund wurden (Abb. 5). Nach 48–72h wurden die Zellen entweder direkt lysiert oder zuerst mit serumfreiem Medium bei definierten Glukosekonzentrationen für weitere acht Stunden „gehungert“ und dann

stimuliert. Die Zellen wurden dann mit einem weichen Schaber von der Platte gelöst und mit etwas PBS (1x) in ein Falcon-Tube pipettiert. Durch Zentrifugation bei 1000 U/min wurden sie als Zellpad konzentriert. Dieses wurde dann in neuem PBS resuspendiert. Die Lyse der Zellen fand durch wiederholtes Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Wiederauftauen statt. Die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugieren bei 6000 U/min entfernt.

Virusvermehrung

Zur Vermehrung der Viren wurden HEK-293-Zellen benutzt, die aus menschlichem Pankreastumorgewebe stammen.

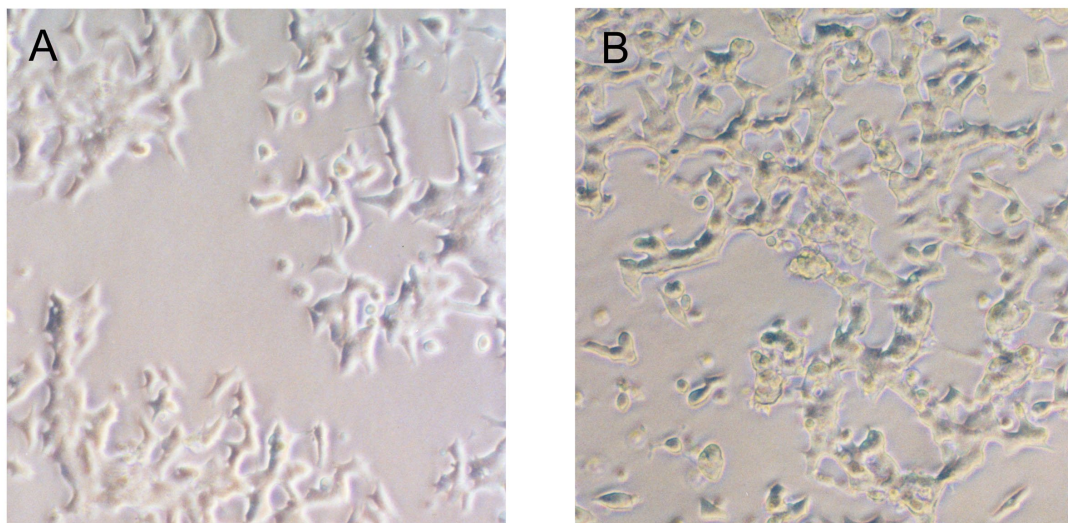


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung der INS1E-Zellkultur, 200fache Vergrößerungen. A. Inkubation in Normalserum, 70%ige Konfluenz. B. Änderungen der Zellmorphologie nach einer Inkubationsdauer von 24 h nach Transfektion mit p50 α -exprimierenden Adenoviren. Die Zellen zeigen eine deutlich rundlichere Form und Abgrenzung untereinander.

2.2.4 RNA-Interferenz

Das Phänomen, dass sich nach dem Einbringen eines Gens in eine Zelle das eingebrachte und das homologe Gen gegenseitig unterdrücken, wird als *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) bezeichnet. RNA-Interferenz ist eine spezielle Form der PTGS, bei der ein Gen durch kleine RNA-Sequenzen ausgeschaltet wird bzw. die Transkription und Translation in das von diesem Gen kodierte Protein verhindert wird. Dieser Zustand ist transient und hält nur wenige Tage an. Dabei wird doppelsträngige RNA (dsRNA) durch ein zytoplasmatisches Enzym, *Dicer*, in kleine Stücke zerteilt, den siRNAs (*small interfering RNA*). Es handelt sich dabei um zwei 21-Nukleotide lange Fragmente, die mit 19 Nukleotiden komplementär sind und einen verschobenen Doppelstrang bilden, so dass an den 3'-Enden zwei ungepaarte Basen überstehen. Die siRNA wird in den RNA-Protein-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. Dieser entfernt zuerst den *sense*-Strang, der die selbe Sequenz wie das Ziel-Gen hat, von der siRNA. In Säugetieren und Fruchtliegen bindet der siRNA-RISC-Komplex mittels der Sequenz des *antisense*-Stranges an die komplementäre Ziel-mRNA und zerschneidet sie etwa zwölf Basenpaare vom 3'-Ende der siRNA entfernt. Ohne die siRNA fehlen dem RISC sequenzspezifische mRNA-Bindungseigenschaften. Durch die Zerstörung der mRNA kann keine Translation in ein Protein stattfinden, das Gen, das die mRNA produziert, ist funktionell ausgeschaltet (*gene silencing*).

Wir setzten eine Kombination von drei siRNAs ein, die von der Firma Qiagen produziert worden waren, mit folgenden Primärsequenzen (*sense strand*):

siRNA-p85 α -1: r(GCU CAU UAG GUC GCC UAA U)dTdT

siRNA-p85 α -2: r(GAG CCC UCU CUG AAA UUU U)dTdT

siRNA-p85 α -3: r(GCG GUA GAG CUU UUA AUC U)dTdT

Zur Durchführung wurde eine Stunde vor der Transfektion das Medium der Zellen gewechselt. Transfiziert wurden typischerweise 6-well-Platten bei einer

Konfluenz von 60–70 %. Pro *well* wurden je 10 µl der siRNA-Lösung (20 µM) in 300 µl serumfreiem Medium und 6 ml SiLentFect™-Transfektionsreagenz in weiteren 300 µl serumfreiem Medium angesetzt. Anschließend inkubierten die Proben 20 min bei Raumtemperatur, wobei sich die Transfektionskomplexe bildeten.

Dieser Ansatz wurde zu den Zellen gegeben und ergab eine Konzentration der siRNA von 100 nM. Für eine Konzentration von 200 nM (50 nM) wurde die doppelte (halbe) Menge an siRNA und SiLentFect eingesetzt. Als Kontrolle wurden 6-well-Platten mit unspezifischer siRNA (Upstate Biotechnology) und solche ohne siRNA parallel inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen für 8 h auf Hungermedium umgesetzt, je nach Versuch gegebenenfalls stimuliert und dann lysiert.

2.2.5 FACS-Zellzyklusanalyse

In der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Dabei emittiert die vorher entsprechend gefärbte Zelle Streulicht und Fluoreszenzimpulse, woraus Aussagen zum DNA-Gehalt der Zelle ableiten werden können.

Wir untersuchten anhand der Parameter Vorwärtsstreulicht (*FSC*, *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (*SSC*, *side scatter*) die DNA-Menge im Zellkern. Da die Zellen in der Ruhe-Phase (G1) einen einfachen DNA-Menge, in der Synthese-Phase (S) zunehmend mehr und kurz vor der Zellteilung (G2) einen doppelten DNA-Gehalt aufweisen, lässt sich die Menge der Zellen in den jeweiligen Phasen quantitativ bestimmen.

Zur Durchführung wurde das Nährmedium von den Zellen abgesaugt und diese mit 2 ml PBS einmal gespült, danach mit 0.5 ml Trypsin über mehrere Minuten inkubiert und einem Zellschaber vorsichtig vom Boden des 6-wells gelöst und mit 1 ml frischem Medium in ein 15 ml-Falcon-Tube überführt, die Platte nochmal mit 2 ml PBS gespült, das ebenfalls in das Falcon-Tube

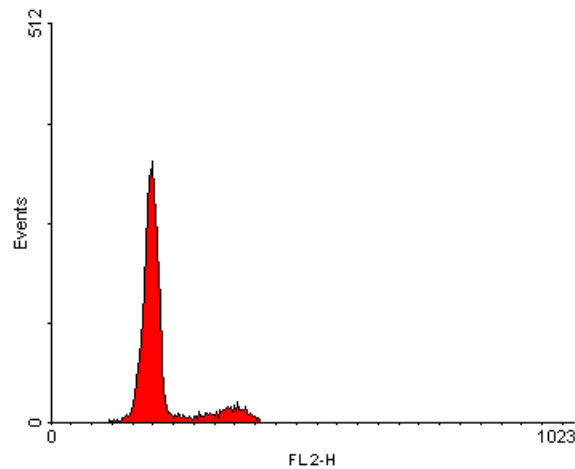


Abbildung 6: grafische Darstellung einer FACS-Zellzyklusanalyse von INS1E-Zellen, inkubiert in Normalserum

übernommen wurde. Die Zellen wurden dann bei 1200 U/min über fünf Minuten abzentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen in 250 µl PBS resuspendiert. Zur Fixierung wurden die suspendierten Zellen unter Schütteln in 2 ml eiskaltes Ethanol (70 %) eingeträufelt. Über einen Filter wurden sie in ein FACS-Röhrchen pipettiert, 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Ethanol-Überstand abgenommen und die Zellen in 2 ml Färbepuffer (staining buffer) (400 µl PI (1 mg/ml), 32 µl DNase-freie RNase, eine Spatelspitze Glukose, 8 ml Aqua dest.) resuspendiert. In diesem inkubierten die Zellen dann zwei Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit, bevor die FACS-Analyse durchgeführt wurde.

Parameter des FACS-Gerätes (Firma Becton-Dickinson):

n = 20.000 Zellen wurden analysiert.

FSC:	4,92	E-1	-FL2:	1,00	347
SSC:	1,00	288	FLZ-W:	4,75	

2.2.6 Immunopräzipitation

Mittels einer Immunopräzipitation (IP) kann man mit Hilfe eines Antikörpers ein spezielles Protein aus einem Lysat isolieren. Dabei bindet das gewünschte Antigen an den Antikörper, der wiederum an Protein G-Agarose-Kügelchen haftet. Die restlichen, unerwünschten Proteine werden dann mit zwei Waschgängen entfernt. Das isolierte Protein kann man dann in einem Immunoblot oder, falls man einen Antikörper gegen eine Kinase benutzt, in einem Kinase-Assay weiter verwenden.

Pro Immunopräzipitation wurden nach Brattford-Proteinbestimmung Zelllysate mit 500-1500 µg Protein, 40 µl Protein G-Agarose und 5 µg Antikörper (bzw. abweichend bei anderer Herstellerangabe) angesetzt. Mit Lysisbuffer wurde auf 500 µl Volumen aufgefüllt und bei 4 °C für mindestens 12 h inkubiert. Dies geschah im Rotator bei ständiger Umwälzung. Der Niederschlag nach Zentrifugation wurde zwei mal mit eiskaltem Lysispuffer gewaschen.

Mit diesem Niederschlag konnte dann ein Kinase-Assay durchgeführt werden. Für einen Western Blot wurde zu dem gewaschenen Präzipitat ohne Überstand 40 µl 2x-Lämmli zugegeben, also im Verhältnis 1:1. Dann wurden die Proben 5 min bei 100 °C denaturiert.

2.2.7 Immundepletion

Im Vorfeld einer Immundepletion (serielle Immunpräzipitation) wurde eine Immunpräzipitation mit dem gewünschten Antikörper wie oben beschrieben durchgeführt. Nach fünf Minuten Zentrifugieren wurde der Überstand über dem Präzipitat in einen neuen Eppendorf-Cup überführt.

Mit 5 µg Antikörper und 40 µl Protein G-Agarose wurde damit eine zweite IP durchgeführt, mit dem daraus resultierenden Überstand der Vorgang wiederum ein drittes Mal wiederholt.

Die Niederschläge dieser drei Durchgänge wurde dann zwei mal mit eiskaltem Lysisbuffer + 0,1 % SDS gewaschen, mit 2x-Lämmli im Verhältnis 1:1 versetzt

und konnte nach 5 min. Erhitzen auf 100 °C in einem Western Blot verarbeitet werden. Dabei wurde ein Teil des Überstandes und Zelllysate parallel mitgeführt.

2.2.8 Gelelektrophorese und Western Blot

In der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei wandern die Moleküle in einem elektrischen Feld durch ein durch ein Gel aus vernetztem Polyacrylamid, das als inerte Matrix dient. Beim anschließenden *Western Blot* (Immunoblot) werden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und dort fixiert. Nach Inkubation mit einem gegen das gesuchte Protein gerichteten Erst-Antikörper und einem gegen den Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper wird mit Hilfe der Lichtemission von ECL (*enhanced chemiluminescence*), einem Detektions-Reagenz, das von der mit dem Zweitantikörper konjugierten Peroxidase des Pferderettichs (*horse reddish peroxidase*) umgesetzt wird, ein Röntgenfilm belichtet.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Brattford-Testes wurden die Proben mit Aqua dest. und Lämmli-Reagenz auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt, typischerweise 2 µg/ml. Ein Fünftel des Probenvolumens bestand dabei aus 5x-Lämmli-Reagenz, es resultierte also eine einfache Lämmli-Konzentration. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für fünf Minuten bei 100 °C erhitzt.

Verwendet wurde das *EC 120 Mini Vertical Gel System* von EC-Apparatus Corporation (Holbrook, New York) mit 12%igen Gelen. Es wurden zweiphasige Gele nach dem Lämmli-System gegossen, bei dem ein Trenngel von einem Sammelgel überschichtet wird, in dem sich die Geltaschen befinden. Pro Geltasche wurden gleiche Mengen von 20–40 µg Protein geladen, 5 µl eines Größen-Markers liefen zur Molekulargewicht-Bestimmung parallel mit. Die Gellaufzeit betrug bei einer Spannung von 120–160 V und einer Stromstärke von 50–100 mA etwa 90 Minuten.

Der anschließende *Western Blot* der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen geschah mittels dem BIO-RAD Minitransblot-System unter Kühlung bei 20 V über zwölf Stunden oder bei 300 A über eine Stunde. Danach wurden die Membranen getrocknet und in 5%iger Trockenmilchlösung in TBS-T eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

In 5%iger Trockenmilchlösung in TBS-T mit dem 1:500 bis 1:5000 verdünnten Erst-Antikörper wurden die geblockten Nitrozellulose-Membranen unter ständigem Schütteln für vier Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach 3 x 5 min. Waschen in TBS-T-Lösung wurden sie in 5%iger Trockenmilchlösung in TBS-T mit dem 1:5000 (bei monoklonalen Erst-Antikörpern) oder 1:10.000 (bei polyklonalen Erst-Antikörpern) verdünnten Zweit-Antikörper geschwenkt. Die Membranen wurden im Anschluss erneut 3 x 5 min. mit TBS-T gewaschen.

Zur Visualisierung des gesuchten Proteins wurden zwei ECL-Systeme genutzt. Mit den *ECL Western Blotting Detection Reagents* der Firma Amersham Biosciences wurden die Membranen eine Minute behandelt. Für Membranen mit schwächeren Signalen wurde alternativ *super signal west dura extended duration substrate* der Firma Pierce für fünf Minuten genutzt.

Belichtet wurde - je nach Intensität des Signals - von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden. Mit Hilfe eines bei der Gelelektrophorese parallel gelaufenen Marker-Protein-Gemisches, das sichtbare Proteine bekannter Größe enthält, wurden die auf dem Film belichteten Banden Protein-Größen zugeordnet. Die Beurteilung der Blots erfolgte primär qualitativ. Sofern nicht abweichend angegeben, wurden n=3 Versuche durchgeführt.

Auf derselben Membran wurde teilweise mit verschiedenen Antikörpern verschiedene Proteine dargestellt. Dazwischen mussten die anhaftenden Antikörper entfernt werden („stripping“), was durch Waschen mit einer SDS/Mercaptoethanol-Lösung bei 60 °C über 20 min geschah. Danach wurde die Membran gründlich mit TBS-T gewaschen und mit 5%iger Milchlösung neu

geblockt, anschließend konnte wie oben beschrieben die erneute Inkubation mit Erst- und Zweit-Antikörper durchgeführt werden.

2.2.9 PI3-Kinase-Assay

Für einen Kinase-Assay wurde eine Immunpräzipitation mit 300–500 µg Proteinlysate und 5 µg Antikörper (gegen IRS-2, p85α oder p-Tyrosin) durchgeführt und anschließend zwei Mal mit Lysis-Buffer gewaschen.

Mit PI3K-Reaktions-Puffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, pH = 7.4) wurde weitere zwei Mal gewaschen und dann 30 µl PI3-K-Lösung (PI3-K-Puffer + 0.1 mg/ml PI) zu jeder Probe zugegeben.

Durch die Zugabe von 20 µl MgCl₂-ATP-Gemisch (200 mM MgCl₂, 200 µM ATP), das 5 µCi [γ-³²P]-ATP enthält, wurde die Reaktion gestartet und nach 20 Minuten durch die Zugabe von 150 µl Chloroform + Methanol-11 + 6N-HCl-Lösung (50:100:1) wieder gestoppt.

Nach der Zugabe von 120 µl Chloroform zu jeder Probe wurde durch Zentrifugation (eine Minute bei 12.000 U/min) die anorganische Phase von der organischen Phase getrennt; Letztere wurde in einen neuen Cup übernommen, mit 120 µl Methanol / 1N-HCl-Gemisch (1:1) versetzt und die Phasen erneut durch Zentrifugation getrennt.

Die Lipide in der wiederum abgenommenen organischen Phase wurden dann für 20 Minuten in einem "Speed Vacuum" konzentriert, in 20 µl Chloroform resuspendiert und auf einer Dünnschicht-Chromatografie-(DC)-Platte aufgetragen. Mit dieser wurde über mehrere Stunden die Chromatografie in DC-Lösung durchgeführt. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurde damit ein Film 48 h belichtet.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Untereinheiten

Im Western Blot lassen sich die Untereinheiten der PI3-Kinase der Klassen Ia und Ib nachweisen (Abb. 7). Die regulatorische Untereinheit p85 α wird in den INS-1E Zellen deutlich stärker exprimiert als die Varianten p50 α und p55 α . Auch p85 β lies sich nachweisen, ebenso wie die katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 γ . Über das Verhältnis der Untereinheiten zueinander lässt sich mit einem qualitativen Western Blot aufgrund der unterschiedlichen Antikörper keine Aussage treffen.

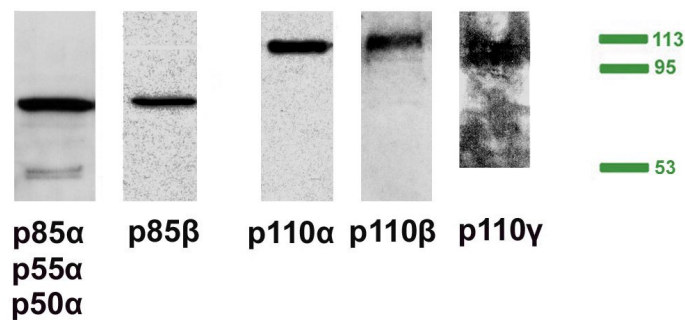


Abbildung 7: Qualitativer Western-yBlot der Untereinheiten der PI3-Kinase in nicht stimulierten INS-1E-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80 %. p55^{PIK}/p55 γ und p110 δ nicht getestet.

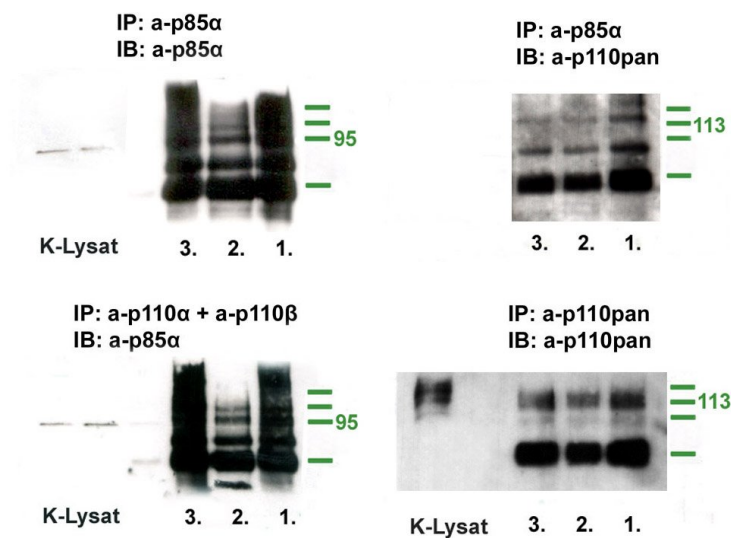


Abbildung 8: Verhältnis p85α – p110α in INS-1E-Zellen. Darstellung von Immunodepletionsserien (IP) und Western Blots (IB) mit verschiedenen Antikörpern.

3.2 Verhältnis der Untereinheiten

Um das Verhältnis der regulatorischen Untereinheit p85α, die unter den Pik3r1-Produkten den größten Anteil ausmacht (Abb. 7), zur den katalytischen Untereinheiten p110α und p110β zu bestimmen, wurde mittels einer Serie von drei Immunpräzipitationen eine Immunodepletion durchgeführt. Beide sind offensichtlich in großer Menge vorhanden, da komplette Depletionen nicht gelangen. Eine deutliche stärkere Depletion von p110 durch p85α als von p85α durch p110 ist jedoch erkennbar, was für einen Überschuss am p85α spricht (Abb. 8).

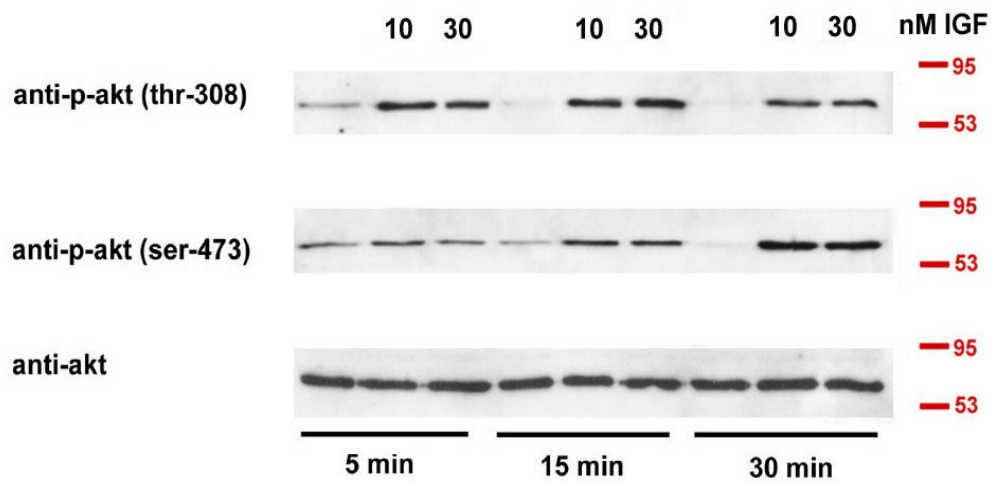


Abbildung 9: Stimulierung der INS-1E-Zellen mit 10 nM und 30 nM IGF-1 bei 10 mM Glukose. Immunoblot gegen aktivierte PKB (p-Akt, thr-308; p-Akt, ser-473) und nicht aktivierte PKB (anti-Akt)

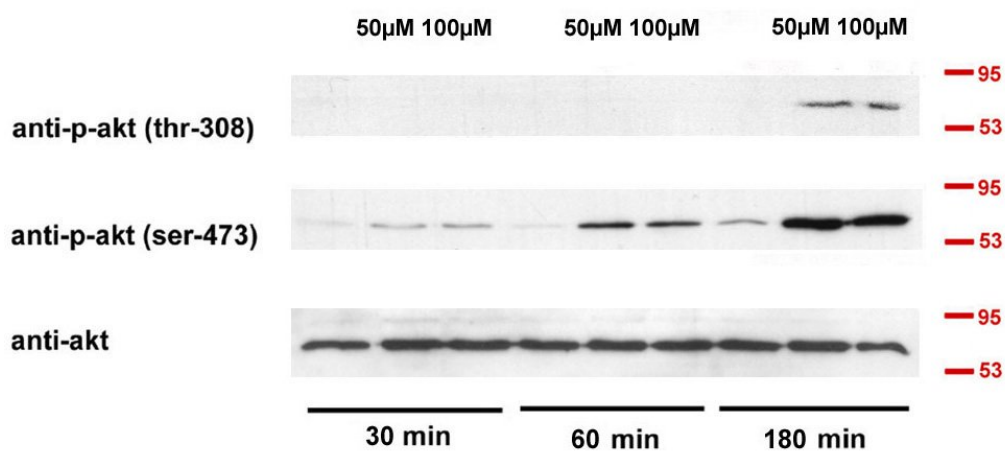


Abbildung 10: Stimulierung der Zellen mit 50 μ M und 100 μ M Forskolin bei 10 mM Glukose. Immunoblot gegen aktivierte PKB (p-Akt, thr-308; p-Akt, ser-473) und nicht aktivierte PKB (anti-Akt)

3.3 Stimulierbarkeit der Zellen

Die verschiedenen Signaltransduktionswege der INS-1E Zellen können durch die Zugabe von bestimmten Agenzien stimuliert werden.

Die Proteinkinase B wird bei Aktivierung durch die PI3-Kinase über Zwischenschritte (PDK-1, PDK-2) an den Aminosäuren Threonin-308 und Serin-473 phosphoryliert. Mit dem Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der PKB konnte so die Aktivierung im Western Blot dargestellt werden (Abb. 9, 10). Als Kontrolle diente ein Antikörper, der an alle Formen der PKB bindet.

Zur Stimulation wurden *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und Forskolin verwendet. Während IGF-1 an den Insulin/IGF-1-Tyrosinkinase-Rezeptor mit der beschriebenen nachfolgenden Aktivierungskaskade bindet, erhöht Forskolin die Konzentration von cAMP im Zytoplasma.

Beide Stimulanzen aktivierten in unseren Versuchen die PKB konzentrations- und zeitabhängig. Während IGF-1 eine schnelle Aktivierung an Threonin-308 und Serin-473 bewirkt, aktiviert Forskolin Serin-473 in stärkerem Ausmaß, was zudem deutlich langsamer geschieht. An Threonin-308 scheint Forskolin nur eine schwache Aktivierung zu bewirken (Abb. 9, 10).

3.4 Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten

Die regulatorischen Untereinheiten p50 α , p55 α und p85 α wurden durch adenoviralen Gentransfer stufenweise überexprimiert. Neben den üblichen unbehandelten Kontrollen wurde eine vierte Zellkulturlinie mit einem unspezifisch für β -Galaktosidase (*LacZ*) codierenden Virus infiziert, um durch das Adenovirus verursachte Effekte auszuschließen. Die Expressierung der Untereinheiten wurde neben der Kontrolle in fünf Stufen (ansteigende MOI) durchgeführt, wobei eine deutliche Überexprimierung gelang (Abb. 11). Die so zusätzlich exprimierten Untereinheiten sind mit Influenza-Hämagglutinin (HA) markiert, mit einem entsprechenden Antikörper wurde im Western Blot die erfolgreiche Transfektion überprüft. Bei der Zellreihe, die mit dem *LacZ*-exprimierenden Virus infiziert wurden, ließ sich kein HA nachweisen, da in

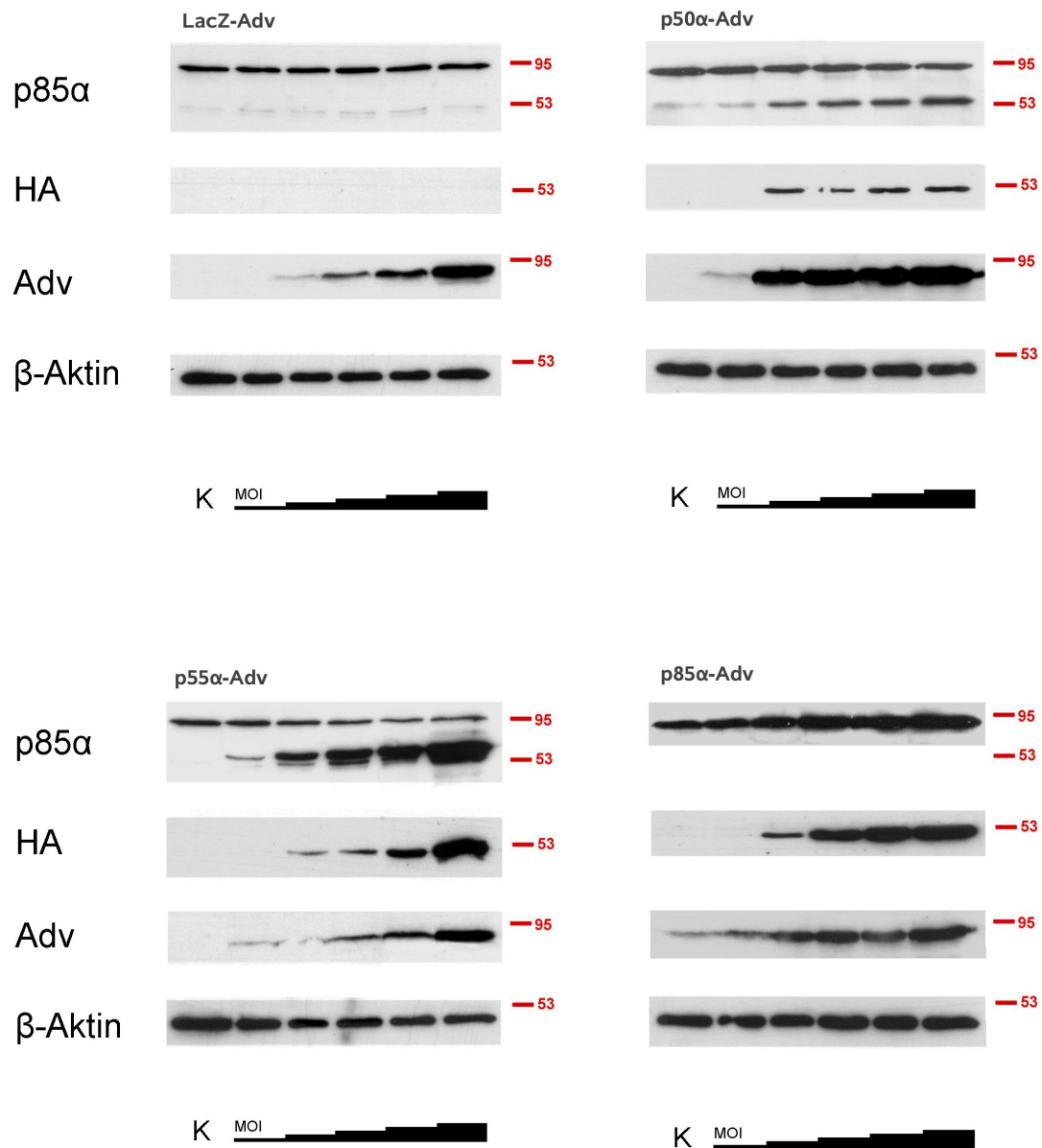


Abbildung 11: Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten durch adenoviralen Gentransfer. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde mit LacZ-, p50α-, p55α- und p85α-codierenden Adenoviren in fünf Infektionsstärken die jeweiligen Proteine überexprimiert. Darstellung von Western Blots mit p85α-, HA-, Adenovirus- und β-Aktin-Antikörpern.

dieser Viruspräparation kein entsprechender Marker integriert worden war. Mit einem Antikörper gegen das *DNA-binding protein* des Adenovirus konnte dieses selbst in allen vier Versuchsreihen nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen β -Aktin diente jeweils als Kontrolle für die Proteinkonzentration und Lademenge der Blots (Abb. 11).

Wir untersuchten verschiedene abwärts liegende Ziele der PI3-Kinase in INS1E-Zellen, die mit Glukose (11 mM) stimuliert wurden. Im Western Blot mit einem gegen die phosphorylierte Form der Proteinkinase B gerichteten Antikörper (p-Akt) zeigte sich bei allen drei Infektionslinien eine Reduktion derselben. Während jedoch bei den p55 α -überexprimierten Zellen die Aktivität

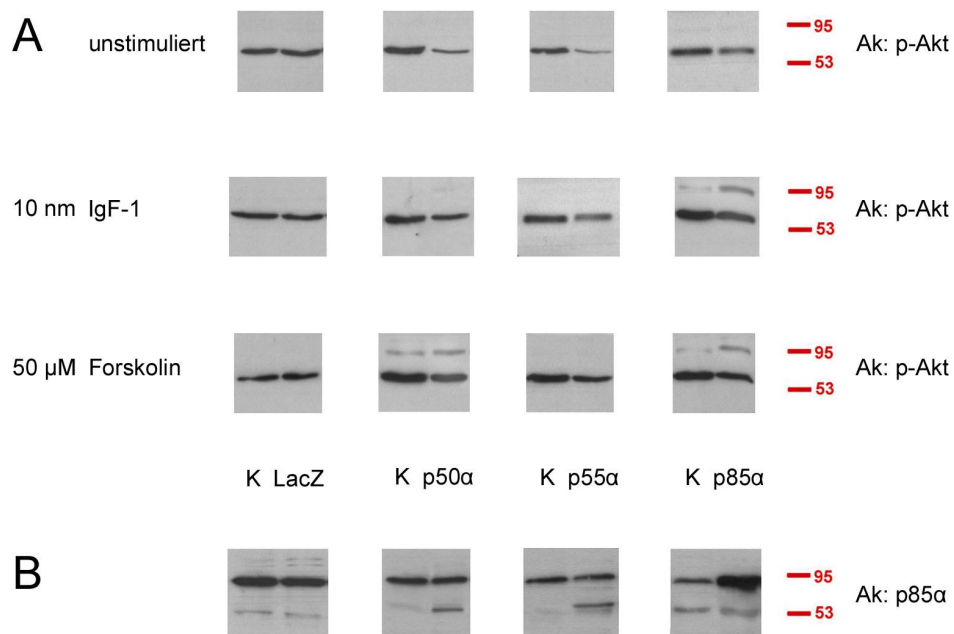


Abbildung 12: Veränderung der Aktivität der Proteinkinase B nach Überexpression der regulatorischen Untereinheiten (MOI etwa 50) bei Stimulation mit IGF-1 und Forskolin (A). Aufgrund verschiedener Western Blots ist ein quantitativer Vergleich zwischen unstimulierten und stimulierten Versuchsansätzen nur eingeschränkt möglich. Darstellung der Überexprimierung mit gegen die Untereinheiten gerichtetem Antikörper (B).

schon bei einer MOI von etwa 20 abfiel, zeigte sich bei den p50 α - und p85 α -infizierten Zellen ein Anstieg des phosphorylierten Anteils und somit eine Zunahme der Aktivität. Erst bei höherer Überexprimierung fiel dieser Anteil wieder ab und sank schließlich unter das Niveau der Kontrollen ab. Bei der LacZ-Infektion war nur eine schwache Veränderung festzustellen. Die Menge der unphosphorylierten Form des Enzyms wurde durch keine der vier Infektionen verändert und blieb auch in den höchsten Infektionsstärken konstant (Abb. 13).

Eine Veränderung dieser Aktivitätsabnahme der Proteinkinase B war auch nach Stimulationen der Kulturen mit IGF-1 oder oder Forskolin unverändert. Im Vergleich zu mitgeführten Kontrollen zeigte sich jeweils eine relative Abnahme des phosphorylierten Anteils der Proteinkinase B, die wiederum bei der Kontrolle mit LacZ nicht gegeben war (Abb. 12).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung der Glykogen-Synthase-Kinase 3. Während sich bei der Kontrollinfektion mit LacZ keine Änderung der Menge der phosphorylierten Form (p-GSK 3) zeigte, war diese bei der Überexprimierung der drei Untereinheiten jeweils vermindert. Dabei war bei p55 α wiederum eine konstant zunehmende Abnahme festzustellen, während sich bei p50 α und p85 α initial erst ein Anstieg mit einer anschließenden Abnahme zeigte. Die Menge der nicht-phosphorylierten Form der GSK 3 war bei allen Infektionen konstant, mit Ausnahme von p55 α , bei der sich erstaunlicherweise eine Abnahme mit zunehmender Infektion zeigte (Abb. 13).

Die Darstellung der phosphorylierten Form der p70s6-Kinase gestaltete sich schwierig. Es deutete sich eine Abnahme bei höherer Infektionsstärke an, eine Aussage über Unterschiede zwischen den verschiedenen überexprimierten Proteinen lässt sich anhand der Ergebnisse nur schwer treffen (Abb. 13).

Bei der Darstellung der phosphorylierten Form des nachgeschalteten Retinoblastom-Proteins (Rb) zeigte bei der Infektion mit p55 α keine wesentliche Änderung im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu nahm der Phosphorylierungsgrad bei p50 α und p85 α deutlich zu, wobei sich im Western Blot Shift-

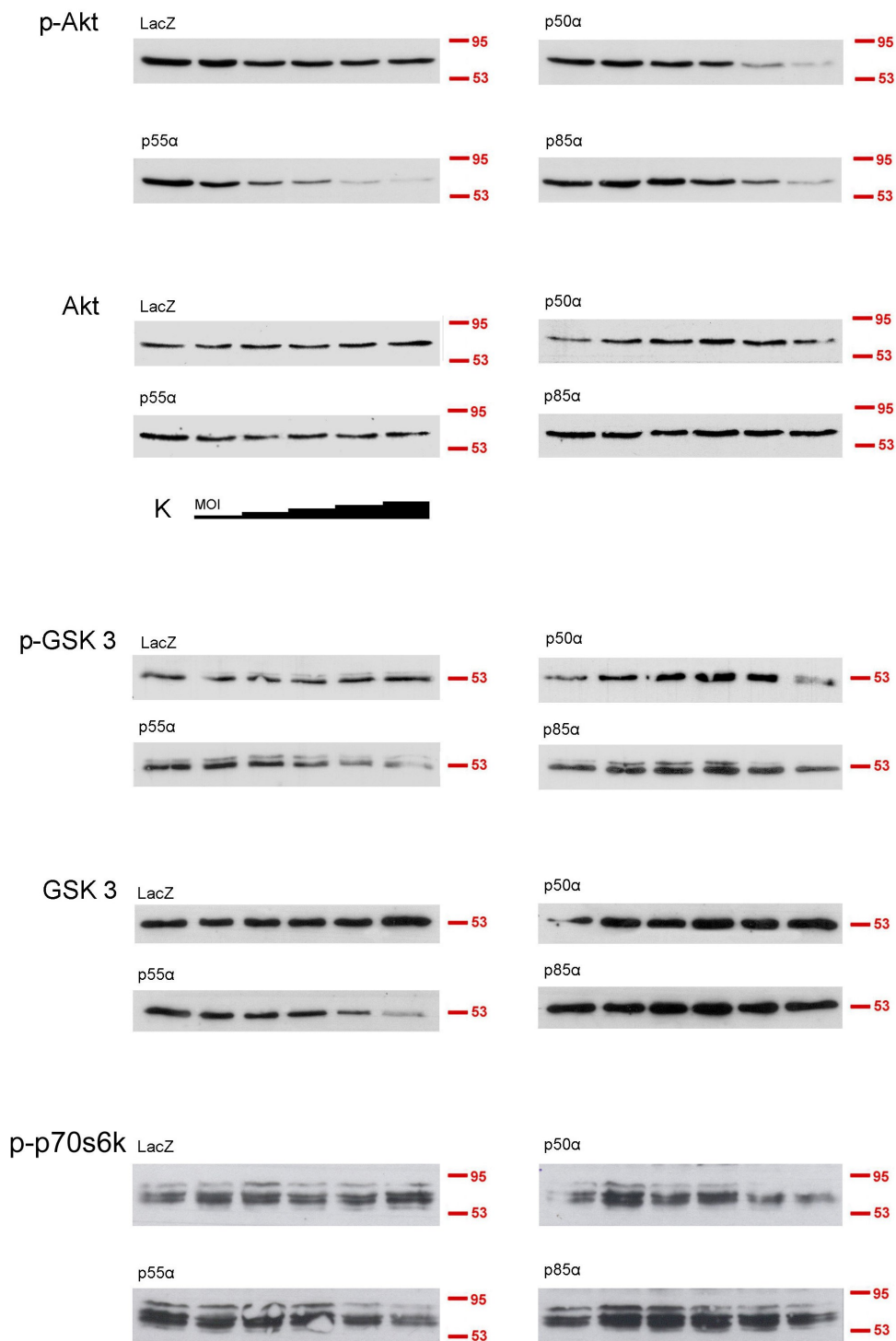


Abbildung 13: Auswirkung der Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf Akt, GSK-3 und p70-s6-Kinase. Western Blots mit den angegebenen Antikörpern.

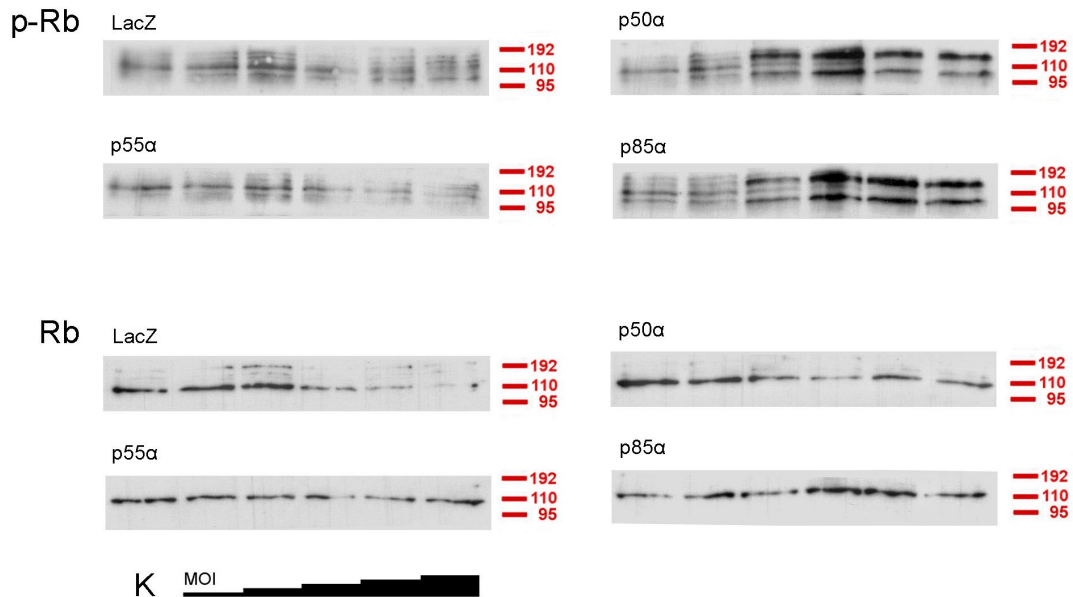


Abbildung 14: Auswirkung des Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf Rb. Western Blots mit Antikörpern isoliert gegen die phosphorylierte sowie gegen alle Formen von Rb.

Effekte der vielfach phosphorylierten Proteine zeigten. Die Rb-Gesamtmenge zeigte im Blot keine wesentlichen Änderung bei allen vier Infektionen (Abb. 14).

Wir untersuchten weiterhin den Aktivierungsgrad paralleler Signaltransduktionswege (p38-MAPK, ERK/CREB). Bei der Überexprimierung von LacZ und p55α zeigte sich keine Änderung des phosphorylierten Anteils der p38-MAPKinase. p50α und p85α hingegen bewirkten eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei p44/42 ERK. Auch hier blieb die Phosphorylierung bei LacZ und p55α konstant, während sie bei p50α und p85α stark zunahm. Die Gesamtmenge von ERK-2 war jeweils unverändert (Abb. 15).

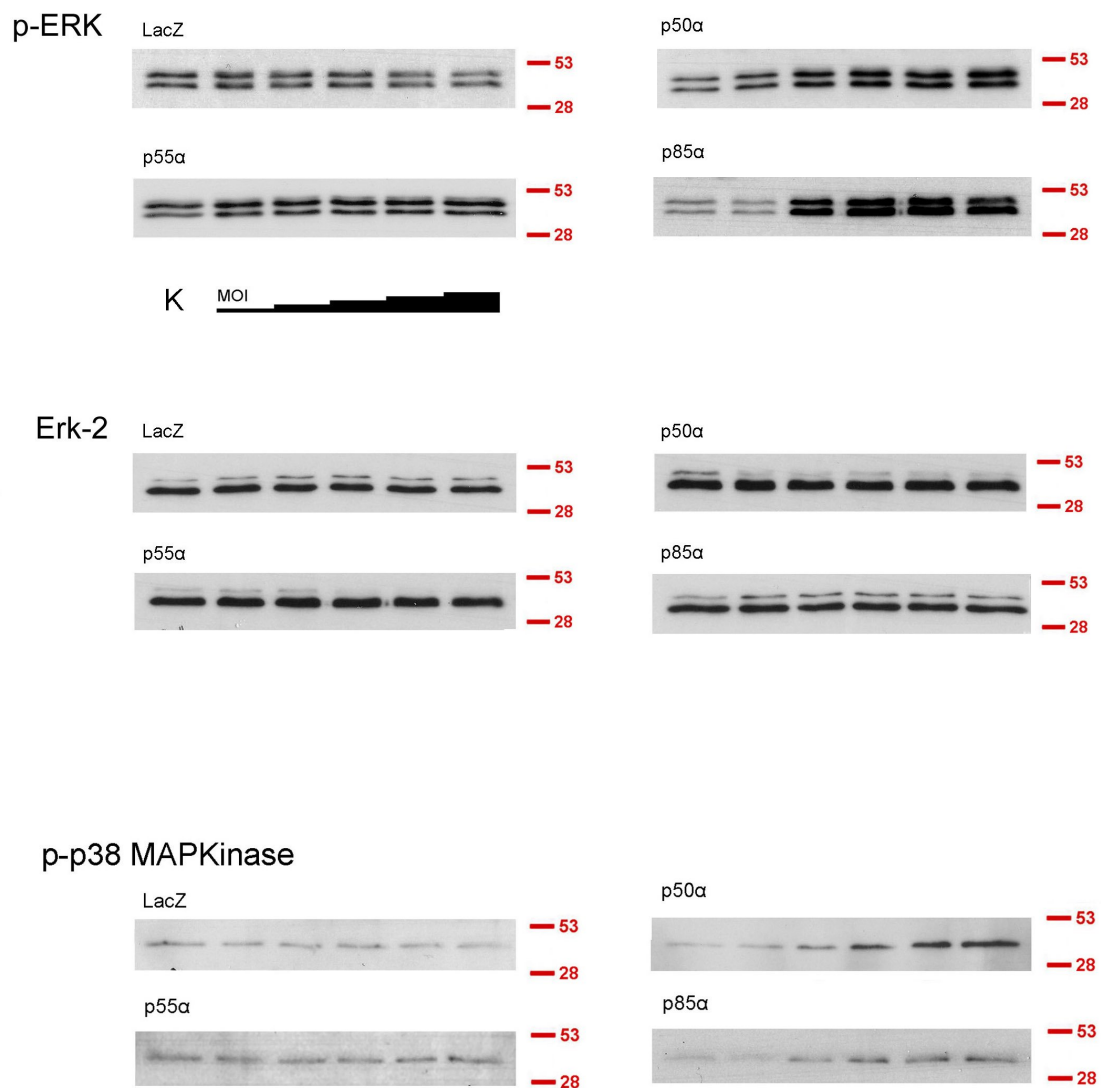


Abbildung 15: Auswirkung des Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf ERK und p38 MAPKinase. Western Blots mit den angegebenen Antikörpern.

3.5 Reduktion von p85 α durch RNA-Interferenz

Mittels RNA-Interferenz durch siRNA-Transfektion mit einer Kombination aus drei spezifisch gegen die mRNA von p85 α gerichteten siRNAs in einer Konzentration von je 50nM gelang die Reduktion der regulatorischen Untereinheit p85 α um den Faktor zwei (Abb. 16A). Als Kontrolle dienten dabei zum einen Lysate von unbehandelten Zellen und zum anderen eine Transfektion mit unspezifischer siRNA, die keinen Einfluss auf Proteine der Signaltransduktion hat. Diese unspezifische siRNA zeigt in verschiedenen Western Blots die selben Ergebnisse wie die nativen Lysate, so dass ein allgemeiner Reduktionseffekt von p85 α durch den Transfektionsprozess selbst ausgeschlossen werden kann.

Die Transfektionen mitsamt der Kontrollen wurden mit 10 nM IGF-1, 50 μ M Forskolin und in einer Kontrollserie nicht stimuliert. Diese Stimulationen hatten auf die Reduktion der Untereinheit p85 α keinen Einfluss. Der Versuch wurde bei Glukosekonzentrationen von 2.5 mM und von 15 mM durchgeführt, was ebenfalls ohne Effekt auf das Transfektionsergebnis selbst blieb. Um Ungleichheiten bei der Konzentrationseinstellung der Proben für den Western Blot auszuschließen, diente ein Western Blot mit einem β -Aktin-Antikörper als Ladekontrolle. Dieser zeigte bei der Transfektion und beiden Kontrollen dieselbe Proteinmenge, was auch einen artifiziellen Reduktionseffekt durch ungleiche Proteinkonzentrationen ausschließt. Stimulationen und Glukosekonzentration zeigten ebenfalls gleiche Mengen an β -Aktin (Abb. 16B).

Mit den transfizierten Zelllysaten wurden analog zu der Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten die Aktivierung untergeordneter Signaltransduktionsziele der PI3-Kinase untersucht. Durch die Reduktion von p85 α zeigte sich im Western Blot mit einem gegen p-Akt gerichteten Antikörper eine verstärkte Aktivierung der Proteinkinase B. Während die Stimulation mit IGF-1 und Forskolin einen Aktivierungsanstieg der Proteinkinase B gegenüber nicht-stimulierten Zellen zeigte, war jeweils eine relative Aktivitätssteigerung durch die Transfektion zu sehen. Die verschiedenen Glukosekonzentrationen hatten dabei keinen wesentlichen Einfluss auf die PKB-Aktivierung (Abb. 17A).

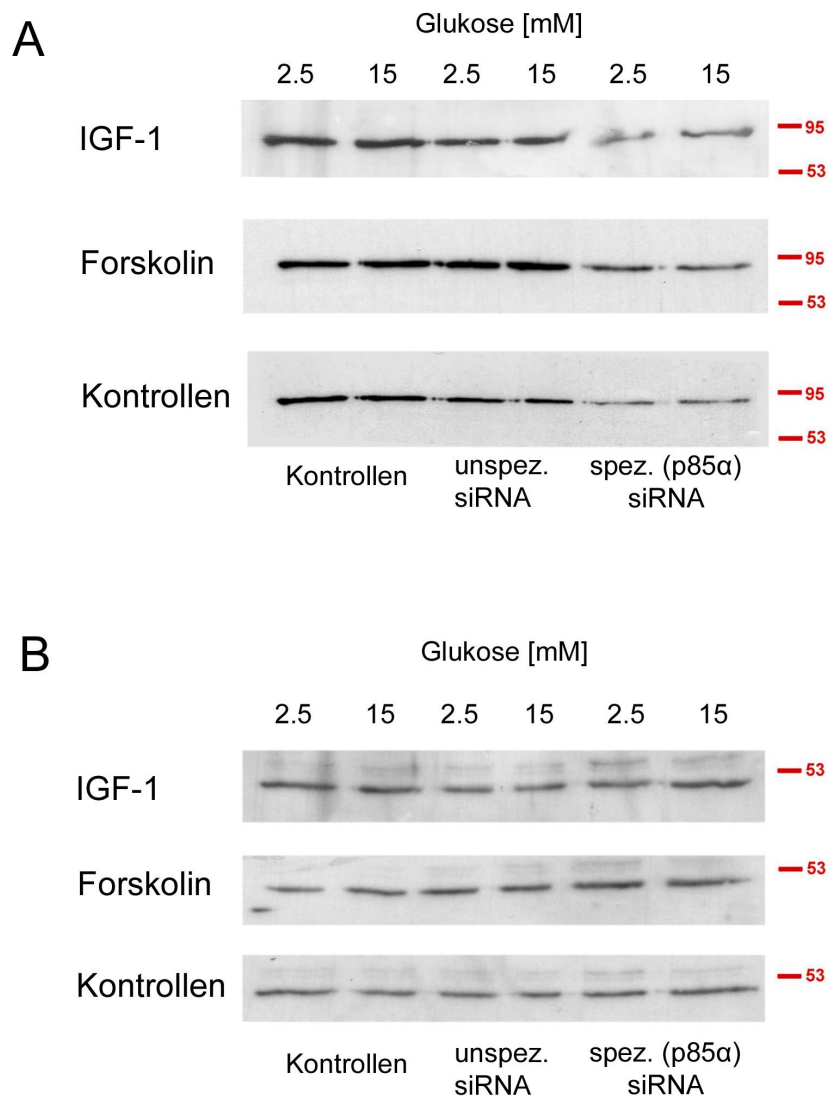


Abbildung 16: Reduktion der regulatorischen Untereinheit p85α durch siRNA-Transfektion. Western Blot mit Antikörper gegen p85α, Zellen in Normalserum (Kontrolle) sowie Stimulationen mit 10 nM IGF-1 und 50 μM Forskolin (A). Ladekontrollen, Western Blot mit β-Aktin-Antikörper (B).

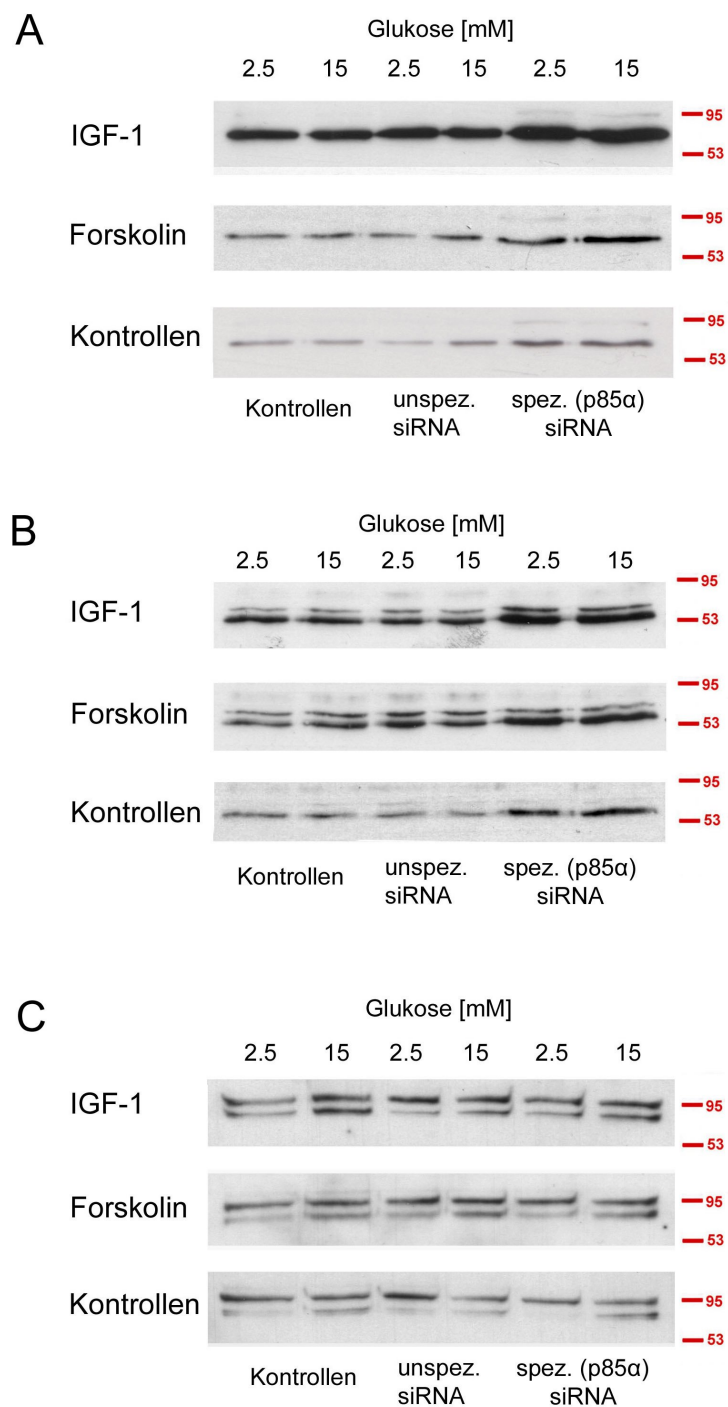


Abbildung 17: Reduktion von p85 α durch siRNA-Transfektion. Western Blots mit Antikörpern gegen p-Akt (A), p-GSK-3 (B) und p-p70s6K (C). Wieder jeweils parallel stimulierte Versuchsreihen mit 10 nM IGF-1 und 50 μ M Forskolin.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei der Aktivierung der Glukose-Synthase-Kinase 3 (GSK-3), die der Proteinkinase B nachgeschaltet ist. Die Stimulation mit IGF-1 und Forskolin zeigte eine Aktivitätssteigerung gegenüber den Kontrollen, die Reduktion von p85 α bewirkte auch hier jeweils eine relative Aktivitätssteigerung gegenüber den nicht-transfizierten Zellen. Auch für die Aktivierung der GSK-3 waren unterschiedliche Glukosekonzentrationen nicht relevant (Abb. 17B).

Ein anderes Bild bot sich hingegen bei der Untersuchung der Aktivität der p70-S6-Kinase. Weder die Reduktion der regulatorischen Untereinheit p85 α noch die Stimulation mit IGF-1 oder Forskolin zeigten eine Aktivitätsänderung. Interessanterweise war bei allen Stimulations-Modi ein Aktivitäts-Unterschied zwischen den verschiedenen Glukosekonzentration zu erkennen. Bei der Konzentration von 15 mM war die Aktivität stärker als bei 2.5 mM, was sich in Wiederholungen bestätigte (Abb. 17C).

3.6 Zellzyklusanalyse

Die nativen INS-1E Zellen zeigten in der Untersuchung mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) eine Verteilung der Zellzyklusphasen, die für differenzierte Zellen typisch ist. Sie weisen einen G1-Phase-Anteil von etwa 85 % auf, einen relativ geringen S-Phase-Anteil von etwa 11–12 % und einen G2-Phase-Anteil von 3–4 % auf (Tab. 2). Ein apoptotischer sub-G1-Anteil war quasi nicht vorhanden.

Bei den adenoviral transfizierten Zellen zeigte sich bei Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten ein differenziertes Bild (Tab. 2, Abb. 18–22). Die LacZ-überexprimierten Kontrollen unterschieden sich in keiner Zyklusphase signifikant von den nativen INS-1E-Kontrollen. Bei Zellen mit p85 α -überexprimierter Untereinheit zeigte sich ein deutlicher Proliferationsreiz, der sich als deutliche Zunahme der S-Phase darstellte, deren Anteil in Abhängigkeit von der Infektionsintensität auf bis zu 46 % (± 15 %) anstieg. Auch der Anteil der Zellen in der G2-Phase war deutlich erhöht, während konsekutiv jener in der G1-Phase stark erniedrigt war. Die Unterschiede zwischen den beiden

Probe	Versuch	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
01	Kontrolle 1	85,1 ± 3,3	12,0 ± 4,4	2,9 ± 2,0
02	Kontrolle 2	85,2 ± 2,2	11,2 ± 3,2	3,7 ± 2,7
03	siRNA-Transfektion 50 nM	88,7 ± 0,7	6,4 ± 0,5	5,0 ± 0,7
04	siRNA-Transfektion 100 nM	88,2 ± 2,1	5,7 ± 0,9	6,1 ± 2,9
05	Infektion mit LacZ, MOI 50	81,0 ± 0,5	10,1 ± 2,0	8,9 ± 1,5
06	Infektion mit LacZ, MOI 100	78,0 ± 4,6	14,5 ± 2,5	7,4 ± 2,8
07	Infektion mit p50α, MOI 50	49,4 ± 9,6	30,8 ± 6,1	19,8 ± 8,4
08	Infektion mit p50α, MOI 100	30,9 ± 9,4	42,4 ± 13,8	26,7 ± 7,6
09	Infektion mit p55α, MOI 50	82,9 ± 1,0	10,7 ± 1,9	6,4 ± 2,9
10	Infektion mit p55α, MOI 100	84,0 ± 1,6	12,9 ± 2,8	3,1 ± 2,3
11	Infektion mit p85α, MOI 50	54,7 ± 2,4	36,3 ± 5,2	9,0 ± 3,5
12	Infektion mit p85α, MOI 100	34,9 ± 15,4	45,7 ± 14,9	20,2 ± 4,2

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Versuche. Die Angaben sind die Mittelwerte der Messwerte von n=3 Versuchen mit Standardabweichung (SD). Alle Werte sind Prozentangaben der gemessenen Zellzahl.

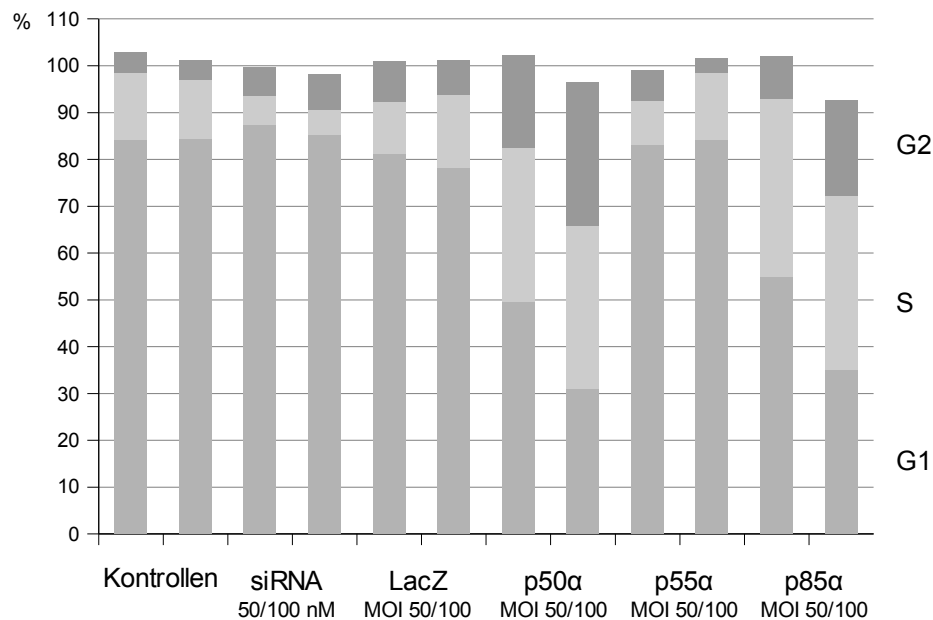


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Zellzyklusphasen anhand der Ergebnisse der FACS-Versuche. Veränderungen der G1-Phase (mittelgrau), der S-Phase (hellgrau) und der G2-Phase (dunkelgrau). Differenzen zu 100 Prozent ergeben sich aus der Verwendung der Mittelwerte von n=3 Versuchen. Zur Benennung der Proben siehe Tabelle 2.

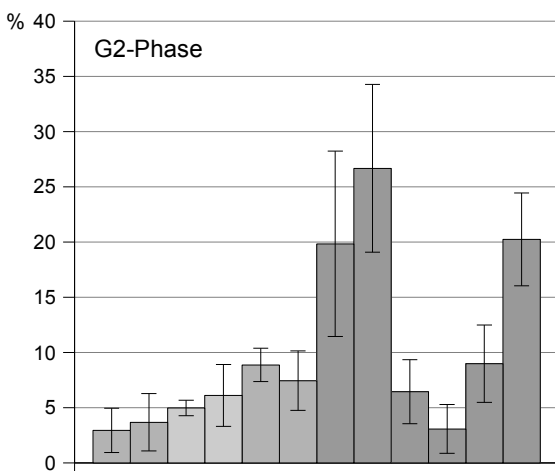
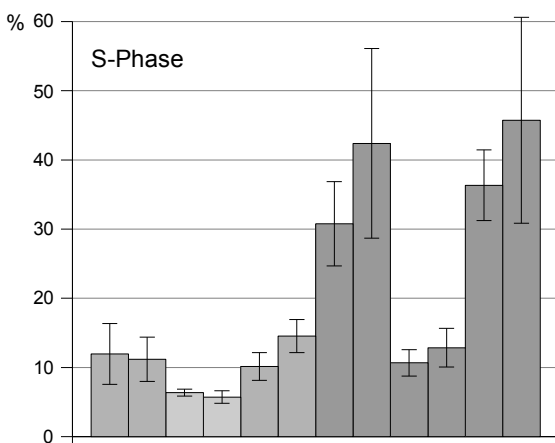
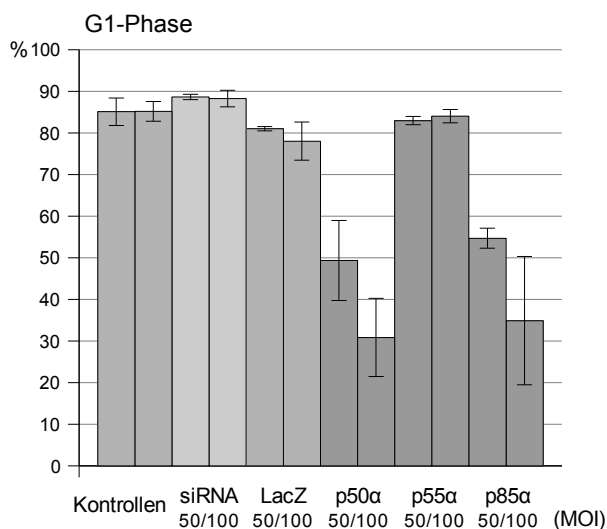


Abbildung 19: Detaillierte Darstellungen der jeweiligen Veränderungen der G1-, S-, und G2-Phase. Darstellung der Ergebnisse der FACS-Versuche. Die Angaben sind die Mittelwerte der Messwerte von n=3 Versuchen mit Standardabweichung (SD). Alle Werte sind Prozentangaben der gemessenen Zellzahl. Numerische Daten und Bezeichnung der Proben in Tabelle 2.

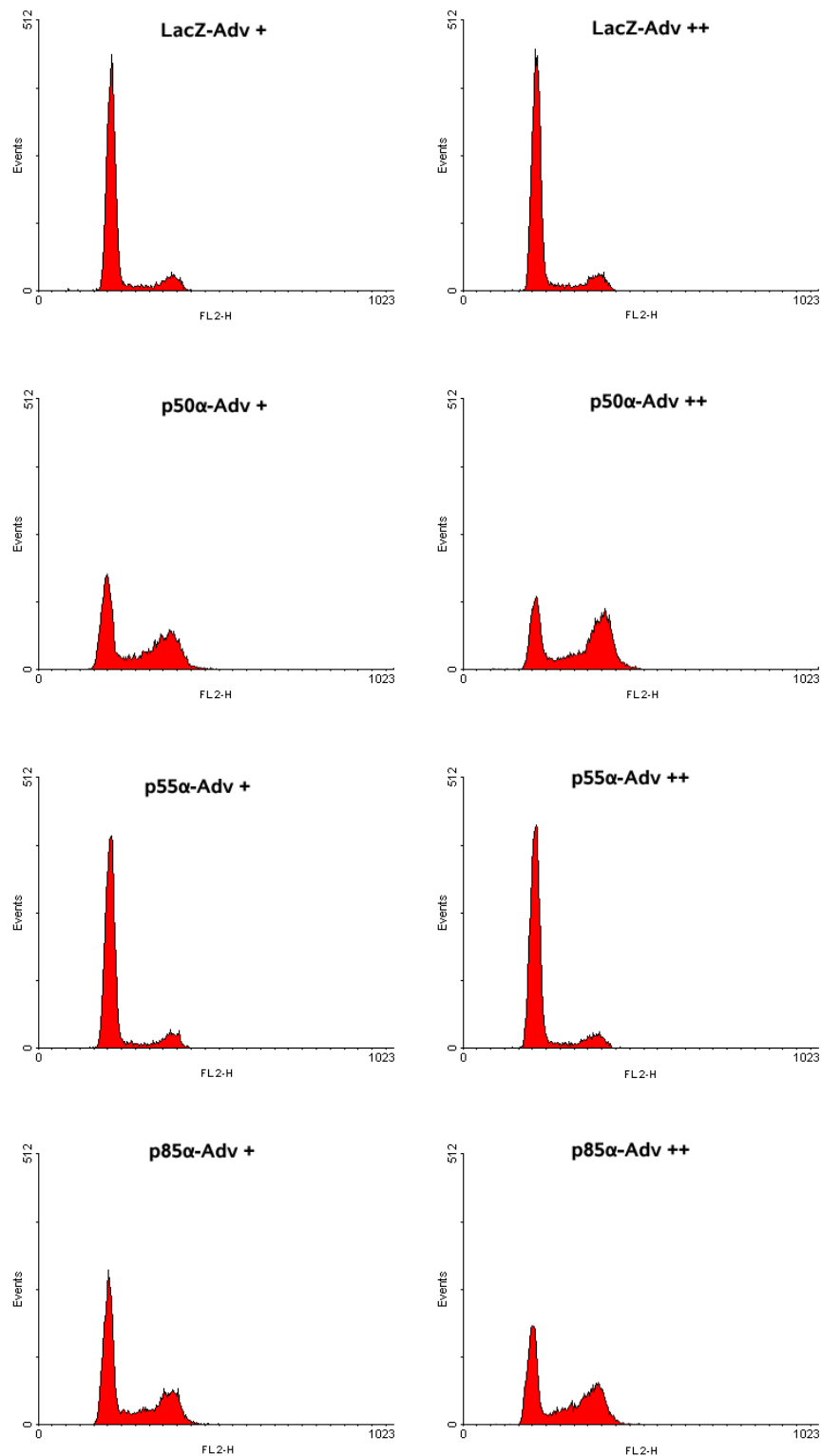


Abbildung 20: FACS-Zellzyklusanalysen mit in zwei Intensitätsstufen überexprimierten regulatorischen Untereinheiten. Dargestellt ist ein typisches Ergebnis aus n=3 Versuchen.

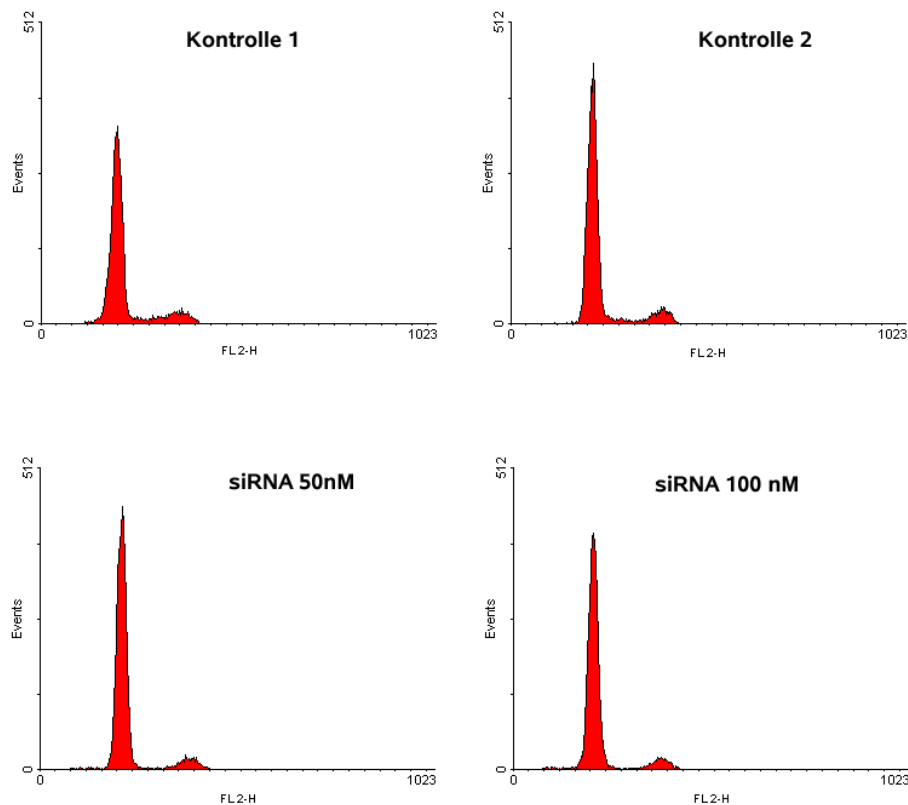


Abbildung 21: FACS-Zellzyklusanalysen, in zwei Intensitätsstufen reduzierte Untereinheit p85 α . Dargestellt ist ein typisches Ergebnis aus n=3 Versuchen.

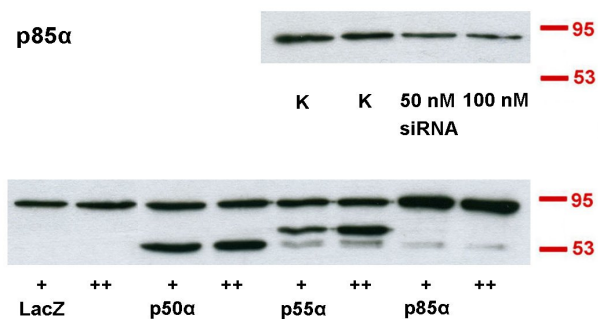


Abbildung 22: Kontrolle zu den FACS-Versuchen, Western Blot mit Antikörper gegen die regulatorischen Untereinheiten.

Infektionskonzentrationen (MOI von 20 und 100) waren dabei deutlich erkennbar, jedoch nicht signifikant. Die p50 α -überexprimierten Zellen zeigten ein Bild, das sich nicht signifikant von diesen Ergebnissen unterschied und mit den gleichsinnigen Western-Blot-Resultaten der p50 α und p85 α -Exprimierung kongruent ist (s. o.). Bei den Zellen mit überexprimiertem p55 α hingegen war Verteilung der G1-, G2- und S-Phase bei den zwei verschiedenen MOI nicht signifikant von den unspezifischen LacZ-Kontrollen sowie den nativen INS1E-Zellen verschieden.

Bei der Transfektion mit siRNA gegen p85 α zeigte sich eine leichte, grenzwertig signifikante Reduktion der S-Phase. Die Veränderungen bei G1- und G2-Phase waren nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollen. Ein Unterschied zwischen Transfektionen mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen (50 nM vs. 100 nM) war dabei ebenfalls nicht zu sehen (Tab. 2, Abb. 18-22).

3.7 PI3-Kinase-Assay

Mittels eines PI3-Kinase-Assays konnte die Aktivität der PI3-Kinase direkt gemessen werden. Dabei zeigten sich im Gegensatz zu nicht transfizierten Kontrollen eine erhöhte Aktivität bei den Proben mit reduzierter Untereinheit p85 α , während eine Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten die PI3-Kinase-Aktivität supprimierte. Bei überexprimiertem p55 α trat diese Aktivitätsabnahme jedoch nicht auf (Abb. 23). Der Kinase-Assay zeigte allerdings in wiederholten Durchführung teilweise inkonsistente Ergebnisse, so dass die Ergebnisse nur mit Einschränkung zu verwerten sind.

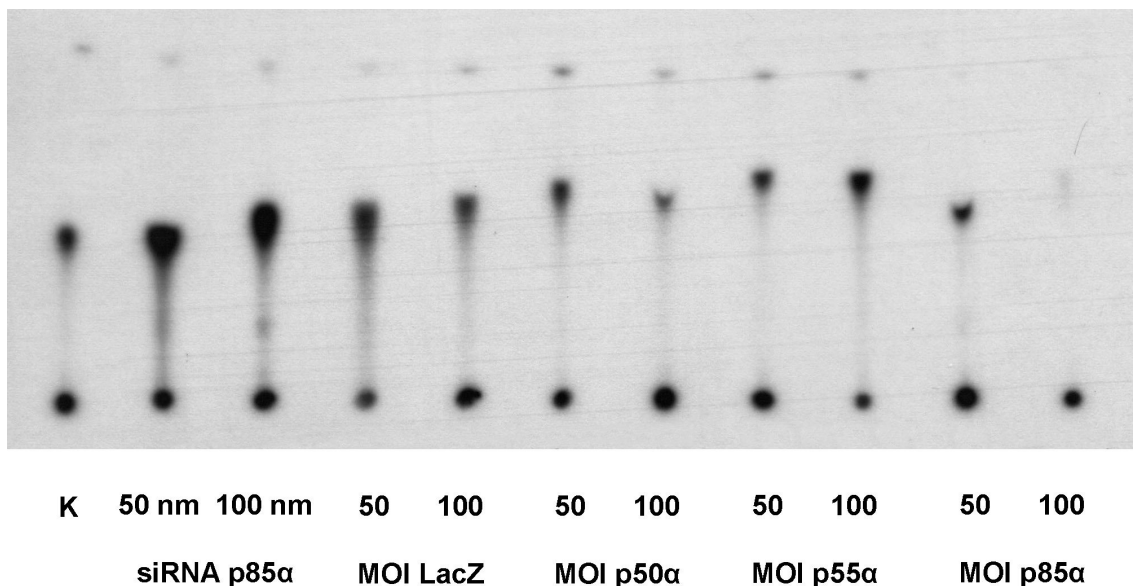


Abbildung 23: PI3-Kinase-Assay (Beispiel), vorhergehend Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper, pro Probe 1 μ Ci p-ATP.

4. Diskussion

4.1 Funktionen der regulatorischen Untereinheiten auf Ebene der PI3-Kinase

Für die regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase haben *Ueki et al.* ein Modell der Aktivitätsregulierung in Fibroblasten aufgestellt (Ueki et al. 2002). Das Verhältnis von p85 α /p110 α -Dimeren zu monomerem p85 α ist dabei für das Ausmaß der PI3-Kinase-Aktivierung verantwortlich. Eine Reduktion von p85 α erhöht die Aktivität durch die Optimierung des p85 α /p110 α -zu-p85 α -Verhältnisses. Ist die Expression von p85 α verringert, betrifft das vorwiegend den Anteil der monomer vorliegenden Proteine, während die p85 α /p110-Dimere in praktisch unveränderter Menge vorliegen. Das so vergrößerte Verhältnis von Dimeren zu Monomeren resultiert in einer Aktivitätssteigerung der PI3-Kinase, die hauptsächlich auf die verminderte Konkurrenz um IRS-Proteine und Substrate der Kinasen zurückgeführt wird. Wahrscheinlich spielt auch eine verminderte allosterische, inhibitorische Beeinflussung der katalytischen Untereinheiten durch monomere regulatorische Einheiten eine Rolle (Ueki et al. 2002). Möglicherweise sind jedoch auch indirekte Mechanismen der Aktivitäts- hemmung durch p85 α , wie etwa Interaktionen mit PTEN, beteiligt (Geering et al. 2007).

Gut untersucht ist dieses Modell der Aktivitätsregulierung bei der Entstehung von Insulinresistenz, bei der die verminderte Aktivität der PI3-Kinase eine wichtige Rolle spielt. Bei experimentell induziertem Diabetes mellitus im Tiermodell findet sich eine Überexprimierung von p85 α -Derivaten (Kerouz et al. 1997) und auch bei menschlichem Diabetes kann eine Zunahme der Untereinheiten festgestellt werden (Bandyopadhyay et al. 2005). Die durch Verminderung der regulatorischen Untereinheiten erhöhte Kinaseaktivität verbessert hingegen die Insulinwirkung und kann eine künstlich induzierte Insulinresistenz wieder reduzieren, was neben p85 α (Terauchi et al. 1999, Mauvais-Jarvis et al. 2002) auch für die kleineren Untereinheiten p50 α und p55 α gilt (Chen et al. 2004). Ein vollständiges experimentelles Ausschalten des p85 α -Gens hat

hingegen eine deutliche Aktivitätsminderung der PI3-Kinase zur Folge, da nicht mehr ausreichend p85 α zur Bildung des Kinasekomplexes zur Verfügung steht (Ueki et al. 2002, Brachmann et al. 2004). Auch in undifferenzierten Zellen konnte eine solche Regulation gezeigt werden. Der Verlust von p85 α in undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus mit homozygoter Nullmutation des *Pik3r1*-Gens führte unter anderem zu einer eingeschränkten Aktivierung von der PI3-Kinase nachgeschalteten Signaltransduktionswegen wie der Proteinkinase B und dem MAPKinase-Signalweg. War das *Pik3r1*-Gen jedoch lediglich heterozygot ausgeschaltet, fand sich eine erhöhte Aktivität von PKB und MAPK (Hallmann et al. 2003).

Die Überexprimierung der regulatorischen Untereinheit p85 α bewirkte in unseren Versuchen mit INS-1E-Zellen Veränderungen, die dem obigen Modell entsprachen. So stellten wir eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase B und der Glykogen-Synthase-Kinase 3 fest. Wendet man das Modell der PI3-Kinase-Aktivierung auf unsere Beobachtungen an, lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass das Verhältnis von p85 α und p85 α /p110 α -Dimeren in INS1E-Zellen leicht unter dem Optimum liegt. Durch die Überexprimierung wurde es initial verbessert und als Folge die nachgeschalteten Effektoren vermehrt aktiviert. Bei einer stärkeren Überexprimierung hingegen nahm die inhibitorische Wirkung der Monomere zu und die Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen wieder deutlich ab.

Die Überexpression von p50 α zeigte ein Bild, das weitgehend dem der Überexpression von p85 α entsprach und ähnliche Funktionen für diese beiden Untereinheiten in der β -Zelle nahelegt. Interessant ist die Diskrepanz, die hingegen die Überexprimierung von p55 α darstellt. Diese bewirkte im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Einheiten keine initiale Aktivierungssteigerung der PKB, der GSK-3 sowie anderen untersuchten Kinasen wie Rb, p38-MAPKinase und ERK. Die durch die anderen regulatorischen Untereinheiten bewirkte Zunahme der Proliferation konnte bei p55 α nicht beobachtet werden. Auch im PI3-Kinase-Assay konnten wir bei einer starken Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten eine dementsprechende Abnahme der Kinaseaktivität bei überexprimiertem p50 α

und p85 α zeigen, während bei p55 α die Aktivität weitgehend unverändert war. Diese Ergebnisse legen unterschiedliche Funktionen der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase in β -Zellen nahe.

Es existieren eine Reihe von Untersuchungen zu spezifischen Funktionen der einzelnen regulatorischen PI3-Kinase-Untereinheiten in verschiedenen Geweben. In humanen Muskelzellen bewirken p50 α , p55 α und p85 α nach Stimulation durch Insulin einen unterschiedlichen Aktivierungsgrad der PI3-Kinase. Während in den Zellen in Ruhe vor allem die kleineren Untereinheiten nachweisbar waren, war durch Insulin ein Anstieg der Konzentration von p85 α und Abbauvarianten desselben sowie von p55 α und p85 β , jedoch nicht von p50 α feststellbar (Shepherd et al. 1997). In differenzierten L6-myelotubulären Zellen zeigt p50 α eine höhere basale Kinaseaktivität als die anderen regulatorischen Untereinheiten. Diese ist zudem in erhöhter Konzentration nicht vermindert. Die Insulinvermittelte Aktivierung der Proteinkinase B und p70-s6-Kinase wird in diesen Zellen durch die Überexprimierung der beiden anderen Einheiten, nicht jedoch durch p50 α , herunterreguliert (Ueki et al. 2000). In hepatischen Leberzellen ist p50 α stärker als die anderen Untereinheiten exprimiert und wird durch Insulin stärker aktiviert (Inukai et al. 1997). Diese Arbeiten deuten auf eine recht spezifische Funktion der p50 α -Untereinheit im Glukose/Insulin-Stoffwechsel hin.

Untersuchungen zu Funktionen von p55 α zeigen vielfältige, weniger spezifische Funktionen. In Nervenzellen kann der N-terminale Terminus von p55 α mit Tubulin interagieren, was möglicherweise eine Verlagerung innerhalb der Zelle bewirkt (Inukai et al. 2000). p55 α spielt weiterhin eine Rolle bei der Nerven-Regeneration nach Verletzungen (Okamoto et al. 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass es in lymphoblastoiden B-Zellen ein wichtiger antiapoptotischer Faktor bei der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus ist, der durch das Virus induziert wird. Dies deutet auf eine Funktion beim B-Zell-Wachstum hin (Spender et al. 2006).

Eine verminderte Aktivität, die isoliert mit der Überexpression von p55 α assoziiert ist, könnte auf einer differenzierte Funktion in β -Zellen beruhen. Ein

möglicher Mechanismus für den beobachteten Unterschied zu den anderen regulatorischen Untereinheiten könnte in einer direkten allosterischen, inhibitorischen Interaktion der N-terminalen Sequenz von p55 α mit p110 oder IRS begründet sein. Solche Protein-Protein-Interaktionen sind für p85 α beschrieben und wurden auch für p55 α in Muskelzellen schon postuliert (Ueki et al. 2000). Für IRS-3 ist zudem eine inhibitorische Wirkung auf den hauptsächlich über IRS-2 vermittelten PI3-Kinase-PKB-Signalweg in INS-1-Zellen beschrieben (Lingohr et al. 2003). Auf Ebene der Phosphoinositide ist eine positive Regulierung von Inhibitoren des PI-Signalweges denkbar. Zumindest für die p85 α -Untereinheit ist eine solcher Mechanismus durch Aktivierung der Phosphatase PTEN bekannt (Taniguchi et al. 2006). Auch eine intrazelluläre Translokation der PI3-Kinase-Dimere in andere Kompartimente der Zelle könnte in Frage kommen, wie ebenfalls für p85 α beschrieben (Inoue et al. 1998).

Die Reduktion von p85 α durch RNA-Interferenz in unserem Zellmodell und die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse unterstützen die Vermutung, dass das Verhältnis von p85 α -Monomeren und aktiven Dimeren der PI3-Kinase unter normalen *in-vitro*-Bedingungen suboptimal ist. Die FACS-Zellzyklusanalysen zeigten eine deutliche Zunahme der Proliferation bei Überexprimierung von p85 α und p50 α , nicht jedoch bei Reduktion von p85 α , wo sich eine Verminderung des Zellwachstums und eine G1-Blockade zeigte.

Nicht kongruent mit diesen Beobachtungen jedoch ist das Verhalten der Proteinkinase B und anderer Downstream-Kinasen, insbesondere die verstärkte Aktivierung der Proteinkinase B. Eine Verminderung der p85 α -Expression sollte, dem dargestellten Regulationsmodell entsprechend, einen weiteren Abfall der PKB-Phosphorylierung zur Folge haben, was jedoch nicht der Fall ist. Ebenfalls unstimmig ist die verstärkte Phosphorylierung der GSK-3. Diese Beobachtung gehen einher mit der im Kinase-Assay erhöhten Aktivität bei reduzierter Untereinheit p85 α .

Eine mögliche Erklärung dieser Phänomene auf der Ebene der PI3-Kinase liegt in einer kompensatorischen Überexpression anderer regulatorischer Unter-

einheiten. Eine solche war bei p50 α und p55 α jedoch nicht zu beobachten. Für p85 β , das von Pik3R2 codiert wird, ist sie in undifferenzierten Stammzellen beschrieben, geht jedoch nach Differenzierung verloren (Hallmann et al. 2003). Bei braunen Adipozyten lies sich hingegen auch in differenzierten Zellen ein kompensatorischer Anstieg von p85 β bei p85 α -Deletion, nicht jedoch umgekehrt, nachweisen (Ueki et al. 2003). Dieser war jedoch nur schwach ausgeprägt, was für eine wichtigere physiologische Rolle von p85 α spricht und für die hier beobachteten Ergebnisse möglicherweise keine ausreichende Erklärung bieten kann. Weitere Erklärungen für die Beobachtungen könnten auf untergeordneten Ebenen der Signaltransduktion liegen.

4.2 Funktionen auf untergeordneten Ebenen

Die Proteinkinase B hat als Haupteffektor der PI3-Kinase auch in β -Zellen die für andere Zelllinien bekannte proliferationsfördernde Wirkung, spielt darüber hinaus aber auch eine Rolle bei β -Zell-spezifischen Funktionen. So entwickeln transgene Mäuse mit fehlender Kinaseaktivität der PKB eine eingeschränkte Glukosetoleranz aufgrund einer reduzierten Insulinsekretion, die durch eine verminderte Exozytose bedingt ist (Berwick et al. 2004). Die Zellgröße und Masse der β -Inselzellen hängt von der PKB-Expression ab. Bei experimenteller Überexprimierung der PKB sind diese signifikant vergrößert, die Glukosetoleranz ist verbessert, bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber experimentell induziertem Diabetes mellitus (Tuttle et al. 2001).

Die Aktivierung der Proteinkinase B durch Phosphorylierung nach Überexprimierung der verschiedenen regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase stellte sich in unseren Ergebnissen differenziert dar. Bei p85 α und p50 α zeigte sich mit ansteigender Expressierung eine Zunahme des aktivierten Anteils der PKB. Dieser fiel nach einem Maximum bei einer MOI von etwa 50 wieder ab. Diese Ergebnisse können mit einer abnehmenden Kinaseaktivität bei überschüssigen monomeren Untereinheiten auf Ebene der PI3-Kinase in Einklang gebracht werden. Bei der Zunahme von p55 α kam es hingegen nicht

zu dem initialen Anstieg der aktivierten PKB, es war hingegen schon bei geringer Überexprimierung eine Abnahme festzustellen.

Parallel dazu verlief die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase 3, die der PKB nachgeschaltet ist. Auch hier zeigte sich eine initiale Zu- und spätere Abnahme der Phosphorylierung der GSK-3 bei Überexprimierung von p85 α und p50 α , bei p55 α hingegen wiederum ein verminderter phosphorylierter Anteil von Anfang an. Interessanterweise nahm bei zunehmender p55 α -Überexprimierung, im Gegensatz zu p50 α und p85 α , nicht nur der phosphorylierte Anteil der GSK-3, sondern auch die Gesamtmenge an GSK-3 ab. Die Proteinkinase B blieb in der Gesamtmenge hingegen weitgehend konstant.

Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtungen hierfür wäre wiederum eine differenzierte Funktion für p55 α in der β -Zelle, die möglicherweise auf einer direkten oder indirekten Interaktion des N-terminalen Endes von p55 α und GSK-3 beruht. Auch außerhalb des Zellmodells ist eine solche bisher nicht beschrieben. Da für die von Pik3r3 abstammende regulatorische Untereinheit p55 γ eine Interaktion mit dem Retinoblastom-Protein bekannt ist (Xia et al. 2003), scheint eine solche Funktion auch für p55 α nicht abwegig. Zwar war die Phosphorylierung von Rb in unseren Versuchen parallel zu GSK-3 ebenfalls erhöht, eine den Beobachtungen an p55 γ entsprechende direkte Interaktion mit Rb würde jedoch nicht die Veränderungen der GSK-3 erklären.

Die Ergebnisse der Reduktion von p85 α durch RNA-Interferenz sind auch auf Effektorebene in sich nicht kongruent. Insbesondere die verstärkte Aktivierung der Proteinkinase B fügt sich nicht in das Modell der Regulation ein, wenn man von den Ergebnissen der Überexpression oben ausgehend annimmt, dass das Verhältnis von p85 α -Monomeren und aktiven Dimeren der PI3-Kinase unter normalen *in-vitro*-Bedingungen leicht unter dem Optimum liegt und eine Reduktion von p85 α dieses weiter verschlechtern würde. Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen, bei der eine deutliche Zunahme der Proliferation bei Überexprimierung von p85 α und p50 α , nicht jedoch bei Reduktion von p85 α gezeigt werden konnte. Eine Verminderung der p85 α -Expression sollte dem zufolge einen weiteren Abfall der PKB-Aktivität zur

Folge haben, was jedoch nicht der Fall ist. Ebenfalls unstimmig ist die verstärkte Phosphorylierung der GSK-3. Verstärkte Phosphorylierung von PKB und GSK-3 passen nicht zu den Zellzyklusveränderungen, bei denen sich eine Verminderung des Zellwachstums und eine G1-Blockade zeigte.

Eine Erklärung für die Ergebnisse könnte auf Ebene der PKB in differenzierten Funktionen von Isoformen liegen. Es ist bekannt, dass PKB α (Akt-1) und PKB β (Akt-2) *in vivo* leicht differierende Funktionen aufweisen (Hirsch et al. 2007). Da in unseren Experimenten ein Antikörper verwendet wurde, der PKB α , β und γ unspezifisch nachwies, könnte den Ergebnissen ein differenzierter Regulationsmechanismus der PKB zugrunde liegen.

Die Untersuchung der p70-S6-Kinase zeigte aus methodischen Gründen nur schwer zu beurteilende Veränderungen des Aktivierungsgrades. Während sich nach Überexprimierung der Untereinheiten ein zu den Veränderungen bei PKB und GSK-3 paralleles Bild andeutete, waren nach Reduktion von p85 α keine Änderungen des Phosphorylierungsgrades sichtbar, was dieselbe Inkongruenz wie bei den beiden anderen untersuchten Effektoren darstellt. Dagegen war die Aktivität bei höherem Glukosespiegel gesteigert. In der Literatur ist für die p70s6-Kinase eine positive Rolle im β -Zellwachstum beschrieben (Dickson et al. 2001).

4.3 Einflüsse auf parallele Wege der Signaltransduktion

Ein paralleler Signalweg, den wir untersuchten, sind die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), die aus den beiden Gruppen der p38-MAPKinase und c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) bestehen. Die PKB interagiert über die drei Aktivatoren der Stress-aktivierten-Proteinkinase-Gruppe (SAPK), ASK1, MLK3 sowie SEK1, mit der p38-MAPKinase und bewirkt eine Inhibition der Apoptose (Song et al. 2005). Daneben wird ein direkter Regulationsweg für die 85 kDa großen regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase auf JNK und p38 vermutet (Ueki et al. 2003). Die p38-MAPKinase scheint eine komplexe Rolle bei der Pathogenese der Insulinresistenz zu spielen. Bei Diabetikern ist in Muskelzellen, in denen regulatorische Untereinheiten erhöht exprimiert und die

Aktivität der PI3-Kinase vermindert sind, die Rate an phosphoryliertem p38 erhöht. Die Gabe von Insulin bewirkt wiederum eine Abnahme des phosphorylierten Anteils (Bandyopadhyay et al. 2005).

Wir beobachteten bei der Abnahme der PKB-Aktivität bei hohen Überexprimierungsraten einen parallelen Anstieg von phosphorylierter p38-MAPKinase. Bei p55 α war ein solcher jedoch nicht zu sehen, obwohl auch hier die PKB-Phosphorylierung deutlich verringert war. Analog zu den Beobachtungen bei p85 α / β (Ueki et al. 2003) könnten hier bisher nicht bekannte Interaktionen auch der kleinen regulatorischen Untereinheiten eine Rolle spielen.

Eine weitere Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind die extrazellulär-aktivierten Kinasen (p42/p44-ERK), die durch die kleinen Kinasen Ras und Raf aktiviert werden (Schaeffer und Weber 1999). Ähnlich wie bei p38-MAPK findet sich eine basale Erhöhung von phosphoryliertem ERK in Muskelzellen von Diabetikern. Insulin bewirkt allerdings keine wie bei der p38-MAPK beschriebene Abnahme (Bandyopadhyay et al. 2005). Die ERK und PKB-abhängigen Signaltransduktionswege scheinen dabei in einem Gleichgewicht zu stehen. Die verminderte PI3-Kinase/PKB-Aktivität führt zu einem kompensatorischen Anstieg der ERK-Aktivität (Dickson et al. 2001). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, da p-ERK bei Überexpression der regulatorischen Untereinheiten in den höheren Expressionsstufen, in denen die PKB-Aktivität erniedrigt ist, deutlich erhöht ist. Bei p55 α fällt dieser Anstieg minimal aus. Die Gesamtmenge an ERK bleibt jeweils unverändert.

4.4 Schlussfolgerungen und Aussichten

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine differenzierte Funktion der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase IA in β -Zellen hin. Die 55 kDa große Untereinheit p55 α scheint dabei eine von den alternativ gespleißten Untereinheiten abweichende Rolle zu spielen. Sie zeigt in unseren Versuchen deutlich von diesen abweichende Auswirkungen auf untergeordnete Signalwege und den Zellzyklus. Mögliche Mechanismen sind Interaktionen auf Ebene

der IRS-Proteine, Phosphoinositid-Phosphorylasen, Proteinkinase B oder GSK-3. Weitere Untersuchungen wie etwa eine differenzierte Reduktion der Untereinheiten in der β -Zelle mit einer Überprüfung der PI3-Kinaseaktivität sind notwendig, um diese genauer zu klären. Die Beobachtungen müssen weiterhin in humanen Zell-Linien überprüft werden, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen gewährleisten zu können.

Letztlich unklar bleibt die bei der Reduktion von p85 α beobachteten Inkongruenzen der Aktivierung der proliferationsfördernden Achse PKB/GSK-3 mit der weitgehend unveränderten Verteilung der Zellzyklusphasen. Neben einer Kompensation durch andere regulatorische Untereinheiten oder differenzierter Aktivierung von PKB-Isoformen müssen letztlich auch Interaktionen mit parallel laufenden Signaltransduktionswegen in Betracht gezogen werden.

Wurde noch in der 90er Jahren hauptsächlich die Insulinresistenz peripherer Gewebe als Hauptfaktor für die Entstehung eines Diabetes mellitus verantwortlich gemacht, ist inzwischen klar, dass daneben auch pathologische Veränderungen der β -Zelle eine Rolle spielen (Cerasi et al. 2001). Ein genaueres Verständnis der Signalwege innerhalb der β -Zelle ist deshalb notwendig, um neue Ansatzpunkte zur Therapie des Diabetes mellitus entwickeln zu können, wie es etwa schon mit *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) gelang (Henquin et al. 2004).

5. Zusammenfassung

Die von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) beeinflussten intrazellulären Signalwege sind für vielfältige Funktionen verantwortlich, darunter die Regulation der Glukoseaufnahme, die Synthese von Glykogen, die Förderung von Proteinsynthese und Zellproliferation, die Verhinderung der Apoptose sowie Regulation von Exozytosevorgängen.

Aktiviert wird die Phosphoinositid-3-Kinase nach Ligandenbindung an Insulin- oder IGF-1-Rezeptoren, die über phosphorylierte IRS-Proteine mit ihr interagieren. Sie ist ein funktioneller Heterodimer und besteht aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, von denen jeweils mehrere Isoformen bekannt sind. Die in dieser Arbeit untersuchten regulatorischen Untereinheiten p85 α , p55 α und p50 α sind Produkte des Pik3r1-Gens. Für verschiedene Zellmodelle sind für diese sowohl positive als auch negative Rollen in der Aktivitätsregulation der katalytischen Untereinheit beschrieben. Da Veränderungen des PI3-Kinase-Signalweges in der β -Zelle des Pankreas bei der Entstehung von Diabetes mellitus eine Rolle spielen, untersuchten wir die Funktionen dieser drei Untereinheiten in der β -Zelllinie INS1E der Ratte.

In INS1E-Zellen konnten wir sowohl die regulatorischen Untereinheiten p50 α , p55 α und p85 α als auch die katalytischen Untereinheiten nachweisen. Die zweifache Überexpression der regulatorischen Untereinheiten durch adenoviralen Gentransfer hemmte die Aktivierung der Proteinkinase B, während eine siRNA-induzierte Unterexpression von p85 α die Aktivierung der PI3-Kinase und Proteinkinase B steigerte. Überexpression von p55 α reduzierte die Menge an phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Glykogen-Synthase-Kinase 3, förderte hingegen nicht die Phosphorylierung von p38 MAPK, p44/42 ERK oder Retinoblastom-Protein, im Gegensatz zu den beiden überexprimierten Untereinheiten p50 α und p85 α . Veränderungen des Verhältnisses von regulatorischen und katalytischen Untereinheiten hatten einen deutlichen Einfluss auf die Zellzyklusregulation. Überexpression von p50 α und p85 α führten zu einem starken Anstieg der S-Phase, im Gegensatz zu p55 α , was auf eine ab-

weichende Rolle von p55 α in der Signaltransduktion der β -Zelle, im Gegensatz zu den anderen Pik3r1-Genprodukten, hindeutet.

Die Funktionen der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase wurden bisher hauptsächlich in insulinsensitiven Geweben untersucht. Dort reduzieren die Untereinheiten p50 α , p55 α und p85 α in ähnlicher Weise die Aktivität der PI3-Kinase und der Proteinkinase B, wenn sie im Überschuss vorliegen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen Unterschiede in Signaltransduktion und Zellzyklusregulation für p55 α in der β -Zelle und deuten eine Sonderrolle an, die über verschiedene Interaktionen vermittelt sein könnte. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese genauer zu klären.

6. Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*. p. 860. Fourth edition, Garland Science, New York. (2002)

Anderson KE, Jackson SP: *Class I phosphoinositide 3-kinases*. Int J Biochem Cell Biol. 35(7):1028-33. (2003)

Antonetti D, Algenstaedt P, Kahn CR: *Insulin Receptor Substrate 1 Binds Two Novel Splice Variants of the Regulatory Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Muscle and Brain*. Mol Cell Biol. 16:2195-2203. (1996)

Asfari M, Janjic, Meda P, Li G, Halban P, Wollheim CB: *Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell Lines*. Endocrinology. 130(1):167-178. (1992)

Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A: *mTOR: a protein kinase switching between life and death*. Pharmacol Res. 50(6):545-9. (2004)

Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM: *Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle*. Diabetes. 54(8):2351-9. (2005)

Beeton CA, Das P, Waterfield MD, Shepherd PR: *The SH3 and BH domains of the p85 α adapter subunit play a critical role in regulating class Ia phosphoinositide 3-kinase function*. Mol Cell Biol Res Commun. 1(2):153-7. (1999)

Belham C, Wu S and Avruch J: *Intracellular signalling: PDK1 - a kinase at the hub of things*. Curr Biol. 9:R93-R96. (1999)

Berven LA, Crouch MF: *Cellular function of p70S6K: A role in regulating cell motility*. Imm Cell Biol. 78:447-451. (2000)

Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavaré JM: *Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles*. J Cell Sci. 117(Pt 25):5985-93. (2004)

Brachmann SM, Ueki K, Engelman JA, Kahn RC, Cantley LC : *Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice*. Mol Cell Biol. 25(5):1596-607. (2004)

- Brownawell A, Kops G, Macara I, Burgering B: *Inhibition of Nuclear Import by Protein Kinase B (Akt) Regulates the Subcellular Distribution and Activity of the Forkhead Transcription Factor AFX*. Mol Cell Biol. 21:3534-3546. (2001)
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu L: *Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor*. Cell. 96:857-868,. (1999)
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science. 282:1318-1321. (1998)
- Cerasi E, Boitard C, Efendic S, Ferrannini E, Henquin JC, Steiner DF: *The islet in type 2 diabetes: back to center stage*. Diabetes. 50 Suppl 1:S1-3. (2001)
- Chan TO, Rodeck U, Chan AM, Kimmelman AC, Rittenhouse SE, Panayotou G, Tsichlis PN: *Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit*. Cancer Cell. 1:181-191. (2002)
- Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, Fisher SJ, Jozsi A, Goodyear LJ, Ueki K, Kahn CR: *p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity*. Mol Cell Biol. 24(1):320-9. (2004)
- Coffer P, Jin J, Woodget J: *Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation*. Biochem J. 335:1-13. (1998)
- Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H et al.: *Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways*. Cell. 110(6):737-49. (2002)
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M: *Hemmings B.A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature. 378: 785-789, 1995. (1995)
- Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Simin: *Tyrosine Phosphorylation of p85 Relieves Its Inhibitory Activity on Phosphatidylinositol 3-Kinase*. Moll Cell Biol. 275:27455-27461. (2001)
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, and Greenberg ME: *Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery*. Cell. 91:231-241. (1997)
- Deora AA, Win T, Vanhaesebroeck B, Lander HM: *A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress*. J Biol Chem. 273(45):29923-8. (1998)

- Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K: *PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity*. EMBO J. 13(3):522-33. (1994)
- Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hu SR, Snow L, Kahn B, Myers MG, Rhodes CJ: *Differential Activation of Protein Kinase B and p70S6K by Glucose and Insulin-like Growth Factor 1 in Pancreatic b-Cells (INS-1)*. J Biol Chem. 276:21110-21120. (2001)
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev. 12:3499-511. (1998)
- Divecha N, Irvine RF: *Phospholipid signaling*. Cell. 80(2):269-78. (1995)
- Djordjevic S, Driscoll PC: *Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases*. Trends Biol. Sci. 27:426-432. (2002)
- Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse SE, Zvelebil MJ, Stein RC, Waterfield MD: *Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin*. Biochem J. 326 (1):139-47. (1997)
- Domin J, Waterfield MD: *Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members*. FEBS Lett. 410(1):91-5. (1997)
- Downes CP, Bennett D, McConnachie G, Leslie NR, Pass I, MacPhee C, Patel L, Gray A: *Antagonism of PI 3-kinase-dependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN*. Biochem Soc Trans. 29(6):846-51. (2001)
- Downward J: *Ras signalling and apoptosis*. Curr Opin Genet Dev. 8:49-54. (1998)
- Dufner A, Thomas G: *Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation*. Exp Cell Res. 253:100-109. (1999)
- Espada J, Peinado H, Esteller M, Cano A: *Direct metabolic regulation of beta-catenin activity by the p85 α regulatory subunit of phosphoinositide 3-OH kinase*. Exp Cell Res. 305(2):409-17. (2005)
- Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, van Obberghen E: *Mechanism of Protein Kinase B Activation by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase*. Moll Cell Biol. 19:4989-5000. (1999)

- Foster F, Traer C, Abraham S, Fry M: *The phosphoinositide (PI) 3-kinase family*. J Cell Scien. 116:3037-3040. (2003)
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A: *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*. Science. 275:665-668. (1997)
- Fruman DA, Cantley LA: *Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems*. Immunology. 14:7-18. (2002)
- Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL: *Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85a gene*. Genomics. 37:113-121. (1996)
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC: *Phosphoinositide kinases*. Annu Rev Biochem. 67:481-507. (1998)
- Geering B, Cutillas PR, Vanhaesebroeck B: *Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits?* Biochem Soc Trans. (Pt 2):199-203. (2007)
- Hallmann D, Trümper K, Trusheim H, Ueki K, Kahn CR, Cantley LC, Fruman DA, Hörsch D: *Altered signaling and cell cycle regulation in Embryonal stem cells with a disruption of the gene for phosphoinositide 3-Kinase regulatory subunit p85alpha*. J Biol Chem. 278:5099-5108. (2003)
- Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ: *p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD*. PNAS. 98:9666-9670. (2001)
- Henquin JC, Boitard C, Cerasi E, Ferrannini E, Steiner DF, Efendic S: *Impact of treatment on islet function in type 2 diabetes*. Diabetes. 53 Suppl 3:S1-5. (2004)
- Herman PK, Emr SD: *Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 10(12):6742-54. (1990)
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF: *Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit*. Cell. 70(3):419-29. (1992)
- Hirsch E, Costa C, Ciralo E: *Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling*. J Endocrinol. 194(2):243-56. (2007)
- Hörsch D, Kahn CR: *Region-Specific mRNA Expression of Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Isoforms in the Central Nervous System of C57BL/6J Mice*. J Comp Neurol. 415:105-120. (1999)

- Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR: *Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2.* J Biol Chem. 8;273(19):11548-55. (1998)
- Inukai K, Funaki M, Nawano M, Katagiri H, Ogihara T, Anai M, Onishi Y, Sakoda H, Ono H, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T: *The N-terminal 34 residues of the 55 kDa regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase interact with tubulin.* Biochem J. 2000 Mar 1;346 Pt 2:483-9. (2000)
- Inukai K, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin BC, Takata B, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asanoi T: *p85a Gene Generates Three Isoforms of Regulatory Subunit for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase), p50a, p55a, and p85a, with Different PI 3-Kinase Activity Elevating Responses to Insulin.* J Biol Chem. 272:7873-7882. (1997)
- Ishiki M, Klip A: *Recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners.* Endocrinology. 146(12):5071-8. (2005)
- Itoh T, Takenawa T: *Phosphoinositide-binding domains - Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling.* Cell Sig. 14:733-743. (2002)
- Jiménez C, Hernández C, Pimentel B, Carrera AC: *The p85 Regulatory Subunit Controls Sequential Activation of Phosphoinositide 3-Kinase by Tyr Kinases and Ras.* J Biol Chem. 277(44):41556-62. (2002)
- Kane LP, Smith Shapiro V, Stokoe D, Weiss A: *Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase.* Curr Biol. 9:601-604. (1999)
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD: *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis and Cancer.* Annu Rev Cell Dev. Biol. 17:615-75. (2001)
- Kerouz NJ, Hörsch D, Pons S, Kahn CR: *Differential Regulation of Insulin Receptor Substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms in Liver and Muscle of the Obese Diabetic (ob/ob) Mouse.* J Clin Invest. 100:3164-3172. (1997)
- Khan AH, Pessin JE: *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways.* Diabetologia. 45:1475-1483. (2002)
- Kido Y, Nakae J, Accili D: *The Insulin Receptor and Its Cellular Targets.* J Clin Endocrin Met. 86:972-979. (2001)

Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Parker PJ: *The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras*. Curr Biol. 4(9):798-806. (1994)

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA: *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation*. J Biol Chem. 271(49):31372-8. (1996)

Kozma SC, Thomas G : *Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K*. Bioessays. 24(1):65-71. (2002)

Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N, Braselmann S: *Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits*. J Biol Chem. 274(24):17152-8. (1999)

Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL: *The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1*. J Biol Chem. 269(32):20648-52. (1994)

Lemmon MA: *Phosphoinositide Recognition Domains*. Traffic. 4:201-213. (2003)

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM: *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. Nat Med. 8(10):1153-60. (2002)

Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, McCuaig JF, Myers MG Jr, Rhodes CJ: *IRS-3 inhibits IRS-2-mediated signaling in pancreatic beta-cells*. Mol Cell Endocrinol. 30;204(1-2):85-99. (2003)

Lizcano JM, Alessi DR: *The insulin signalling pathway*. Curr Biol. 12:R236-238. (2002)

Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID: *Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism*. Oncogene 18:8024-32. (1999)

Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A: *Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer*. J Cell Physiol. 192(2):125-30. (2002)

Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannacone M, Accili D, Cantley LC, Kahn CR: *Reduced expression of the murine p85a subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes*. J Clin Invest. 109:141-149. (2002)

Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P: *Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells*. Endocrinology. 145(2): 667-678. (2003)

Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C, Saito I: *Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome*. PNAS 93(3):1320-4. (1996)

Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N: *Cyclin D Expression Is Controlled Post-transcriptionally via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent Pathway*. J Biol Chem. 273: 29864-29872. (1998)

Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR: *Forkhead Transcription Factors Are Critical Effectors of Cell Death and Cell Cycle Arrest Downstream of PTEN*. Mol Cell Biol. 20:8969-8982. (2000)

Okamoto T, Namikawa K, Asano T, Takaoka K, Kiyama H: *Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury*. Brain Res Mol Brain Res. 24;131(1-2):119-25. (2004)

Olson MF, Marais R: *Ras protein signalling*. Sem Immun. 12:63-73. (2000)

Persad S, Attwell S, Gray V, et al.: *Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343*. J Biol Chem. 276:27462-9. (2001)

Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC: *Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit*. Science. 263(5153):1609-12. (1994)

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG, Sun XJ, White MF: *The Structure and Function of p55PIK Reveal a New Regulatory Subunit for Phosphatidylinositol 3-Kinase*. Mol Cell Biol. 15:4453-4465. (1995)

Pullen N, Dennis P, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma S, Hemmings B, Thomas G: *Phosphorylation and Activation of p70s6k by PDK1*. Science. 279:707-710. (1998)

Pullen N, Thomas G: *The modular phosphorylation and activation of p70s6k*. FEBS letters. 410:78-82. (1997)

- Rebollo A, Martinez C: *Ras proteins: recent advances and new functions*. Blood. 94(9):2971-80. (1999)
- Reich NC, Sarnow P, Duprey E, Levine AJ: *Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein*. Virology 128:480–484. (1983)
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD and Downward J: *Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation*. EMBO J. 15(10):2442-2451. (1996)
- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM: *Structure, function, and biology of SHIP proteins*. Genes Dev. 14(5):505-20. (2000)
- Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J: *p70 S6 Kinase Is Regulated by Protein Kinase C and Participates in a Phosphoinositide 3-Kinase-Regulated Signalling Complex*. Mol Cell Biol. 19:2921-2928. (1999)
- Saltiel AR, Kahn CR: *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature. 414:799-806. (2001)
- Schaeffer HJ, Weber MJ: *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. Mol Cell Biol. 19(4):2435-44. (1999)
- Shepherd PR, Nave BT, Rincon J, Nolte LA, Bevan AP, Siddle K, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H: *Differential regulation of phosphoinositide 3-kinase adapter subunit variants by insulin in human skeletal muscle*. J Biol Chem. 272(30):19000-7. (1997)
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, et al.: *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. Nat Med. 8:1145–52. (2002)
- Song G, Ouyang G, Bao S: *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med. 9(1):59-71. (2005)
- Spender LC, Lucchesi W, Bodelon G, Bilancio A, Karstegl CE, Asano T, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Vanhaesebroeck B, Farrell PJ: *Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p55alpha regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells*. J Gen Virol. 87(Pt 10):2859-67. (2006)
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F and Hawkins PT: *Dual role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. Science. 277:567-570. (1997)

Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al: *Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase*. Science. 269(5224):690-3. (1995)

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet. 365(9467):1333-46. (2005)

Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, Birnbaum MJ: *The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism*. J Biol Chem. 274(25):17934-40. (1999)

Taniguchi CM, Tran TT, Kondo T, Luo J, Ueki K, Cantley LC, Kahn CR: *Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha suppresses insulin action via positive regulation of PTEN*. PNAS 8;103(32):12093-7. (2006)

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y et al.: *Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase*. Nat Genet. 21(2):230-5. (1999)

Tolias KF, Cantley LC, Carpenter CL: *Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases*. J Biol Chem. 270(30):17656-9. (1995)

Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ: *Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB?*. Nat Med. Oct;7(10):1133-7. (2001)

Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn R: *Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-Kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit*. Mol Cell Biol. 21:8035-8046. (2000)

Ueki K, Fruman DA, Brachmann S, Tsen Y-H, Cantley LC, Kahn CR: *Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-Kinase regulates cell signaling and survival*. Mol Cell Biol. 22:965-977. (2002)

Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, Cantley LC, Kahn CR: *Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling*. J Biol Chem. 278(48):48453-66. (2003)

van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM: *Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation*. J Biol Chem. 273:13150-13156. (1998)

- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD: *Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases*. Exp Cell Res. 253:239-254. (1999)
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR: *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J. 346:561-576. (2000)
- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD: *Synthesis and Function of 3-phosphorylated Inositol Lipids*. Annu Rev Biochem. 70:535-602. (2001)
- Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD: *P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes*. PNAS. 94(9):4330-5. (1997)
- Vara JF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Barun M: *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Canc Treat Rev. 30:193-204. (2004)
- Vazquez F, Sellers WR: *The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling*. Biochim Biophys Acta. 1470(1):M21-35. (2000)
- Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al.: *Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*. Nat Med 8:1136-44. (2002)
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR: *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest. 103:931-943. (1999)
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL: *Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling*. Nature. 402(6759):313-20. (1999)
- Weng Q, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, and Avruch J: *Regulation of the p70 S6 Kinase by Phosphorylation in Vivo*. J Biol Chem. 273:16621-16629. (1998)
- White MF: *The insulin signalling system and the IRS proteins*. Diabetologia. 40: S2-S17. (1997)
- Wymann MP, Bjorklof K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Laffargue M: *Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy*. Biochem Soc Trans. 31(Pt 1):275-80. (2003)
- Wymann MP, Pirola L: *Structure and function of phosphoinositide 3-kinases*. Biochim Biophys Acta. 1436(1-2):127-50. (1998)

Xia X, Cheng A, Akinmade D, Hamburger A: *The N-Terminal 24 Amino Acids of the p55 Gamma Regulatory Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase Binds Rb and Induces Cell Cycle Arrest*. Mol Cell Biol. 23:1717-1725. (2003)

Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H: *Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors*. Int J Oncol. 24(4):893-900. (2004)

Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr G, Backer JM: *Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit*. Mol Cell Biol. 18:1379-1387. (1998)

Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA: *Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85*. J Biol Chem. 269(29):18727-30. (1994)

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC: *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells.* Nat Cell Biol. 3(3):245-52. (2002)

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Die Aufbau von Phosphatidylinositol und die Phosphorylierung durch die PI3-Kinasen an der 3'-Position des Inositol-Ringes.....	2
<i>Abbildung 2:</i> Die definierenden Struktureigenschaften der katalytischen Untereinheiten der verschiedenen PI3-Kinase-Klassen in Säugetieren.....	4
<i>Abbildung 3:</i> Struktur der regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase IA	8
<i>Abbildung 4:</i> Schematische Darstellung der Aktivierung der PI3-Kinase.....	10
<i>Abbildung 5:</i> Lichtmikroskopische Darstellungen der INS1E-Zellkultur in Normalmedium und nach Virustransfektion (Fotografien von Antti Rossi).....	26
<i>Abbildung 6:</i> Grafische Darstellung einer FACS-Zellzyklusanalyse von INS1E-Zellen, inkubiert in Normalserum.....	29
<i>Abbildung 7:</i> Qualitativer Western Blot der Untereinheiten der PI3-Kinase in nicht stimulierten INS-1E-Zellen.....	34
<i>Abbildung 8:</i> Verhältnis p85a – p110a in INS-1E-Zellen. Darstellung von Immunodepletionsserien (IP) und Western Blots (IB).....	35
<i>Abbildung 9:</i> Stimulierung der INS-1E-Zellen mit IGF-1. Western Blots mit den angegebenen Antikörpern gegen phosphorylierte sowie gegen alle Formen der Proteinkinase B.....	36
<i>Abbildung 10:</i> Stimulierung der Zellen mit Forskolin. Western Blots mit den angegebenen Antikörpern gegen phosphorylierte sowie gegen alle Formen der Proteinkinase B.....	36
<i>Abbildung 11:</i> Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten durch adenoviralen Gentransfer. Western Blots mit p85 α -, HA-, Adenovirus- und β -Aktin-Antikörpern.....	38

<i>Abbildung 12:</i> Veränderung der Aktivität der Proteinkinase B nach Überexpression der regulatorischen Untereinheiten bei Stimulation mit IGF-1 und Forskolin.....	39
<i>Abbildung 13:</i> Auswirkung der Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf Akt, GSK-3 und p70-s6-Kinase (Western Blots).....	41
<i>Abbildung 14:</i> Auswirkung des Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf Rb (Western Blots).....	42
<i>Abbildung 15:</i> Auswirkung des Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten auf ERK und p38 MAPKinase (Western Blots).....	43
<i>Abbildung 16:</i> Reduktion der regulatorischen Untereinheit p85 α durch siRNA-Transfektion (Western Blots). Stimulationen mit IGF-1 und Forskolin.....	45
<i>Abbildung 17:</i> Reduktion von p85 α durch siRNA-Transfektion. Western Blots mit Antikörpern gegen p-Akt, p-GSK-3 und p-p70s6K.....	46
<i>Abbildung 18:</i> Vergleichende Darstellung der Zellzyklusphasen anhand der Ergebnisse der FACS-Versuche.....	48
<i>Abbildung 19:</i> Detaillierte Darstellungen der jeweiligen Veränderungen der G1-, G2-, und S-Phase. Ergebnisse der FACS-Versuche.....	49
<i>Abbildung 20:</i> Grafische Darstellung der FACS-Zellzyklusanalysen, Ergebnisse der Überexprimierung der regulatorischen Untereinheiten.....	50
<i>Abbildung 21:</i> Grafische Darstellung der FACS-Zellzyklusanalysen, Ergebnisse der Reduktion von p85 α	51
<i>Abbildung 22:</i> Expressionskontrolle zu den FACS-Versuchen, Western Blot mit Antikörper gegen die regulatorischen Untereinheiten.....	51
<i>Abbildung 23:</i> Ergebnisse des PI3-Kinase-Assays.....	53

7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampère
A. dest.	destilliertes Wasser
Adv	Adenovirus
Ak	Antikörper
Akt	Synonym für Proteinkinase B (PKB)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ci	Curie
CREB	<i>C-responsive element binding</i>
DC	Dünnschicht-Chromatografie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ERK	<i>extracellular-related kinase-1</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS, FBS	<i>fetal calf/bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horse-reddish peroxidase</i>
IB	<i>Immunoblot = Western Blot</i>
ID	Immundepletion = serielle Immunopräzipitation
IGF-1	<i>Insulin-like growth-factor-1</i>
IP	Immunopräzipitation
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
K	Kontrolle
kDa	Kilo-Dalton
nm	Nanometer
M	Mol

ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
P70S6K	P70-S6-Kinase
PBS	<i>phospho-buffered saline</i>
PDK	<i>phosphoinositide dependent kinase</i>
PI	Phosphatidylinositol
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K, PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase oder Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pty, PY	Phospho-Tyrosin
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	<i>ribonuclein acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNA-I	<i>RNA interference</i>
rpm, U/min	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering ribonuclein acid</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween</i>
V	Volt

7.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg

Aumüller, Arnold, Bart, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Gerdes, Geus, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hörsch, Hofmann, Jungclas, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lill, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Moll, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Rothmund, Röhm, Schäfer, Schnabel, Seitz, Studer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zielke

In Kassel

Wolf, Steinhauer, Ritter, Pausch, Dorlars, Schorr, Neuzner, Feige, Möller

In Durban

Moodley, de Kock, Naidoo, Ramkelawon

In Schwalmstadt

Schäfer, Weiher, Niggemeier, Stopinski, Rudde-Teufel, Kley, Lange, Formoli

7.5 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen; ihnen allen gebührt mein Dank.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Arnold und Herrn Prof. Dr. Gress für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel durchführen zu können. Herrn PD Dr. Dieter Hörsch danke ich für die Überlassung der Arbeit und für das von Anfang an in mich gesetzte Vertrauen, für das Beibringen der genutzten Techniken, die kontinuierliche Rückprache und Diskussion in Bezug auf Versuchsergebnisse, sowie für die Möglichkeit, die Arbeit auf verschiedenen Veranstaltungen zu präsentieren.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Dr. Jörg Schrader und Eleni Aprin-Archontidou, sowie auch den anderen Mitarbeitern des Forschungsbereiches 3 danke ich für die intensive Einarbeitung und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor sowie Diskussion und Lösung von Problemen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maisch sei für die Möglichkeit gedankt, die FACS-Analysen durchzuführen zu können.

Nicht zuletzt dank meiner Mitdoktoranden Antti, Donata, Dorothe, Jigar, Julia, Sandra und Susanne war das Arbeitsklima in der Gruppe stets angenehm; durch die Doktorandentreffen war auch für eine persönliche Note gesorgt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir stets durch Unterstützung in jeglicher Hinsicht beistanden und mir einen erfolgreichen Abschluss des Studiums und dieser Arbeit ermöglichten. Ein herzlicher Dank gilt auch allen Freunden und Bekannten, die in vielerlei Hinsicht unterstützten, aufmunterten, hilfreich und nicht zuletzt tolerant waren, auch wenn am Wochenende Arbeit im Labor anstand.